

Untersuchungen zum Nachweis und zum Vorkommen von Ergotalkaloiden in Futtergräsern

JASMIN RIEMEL

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAIFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
Professur für Milchwissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber

**Untersuchungen zum Nachweis und zum Vorkommen
von Ergotalkaloiden in Futtergräsern**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Jasmin Riemel

Tierärztin aus Bergisch Gladbach

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. M. Kramer

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber
2. Prof. Dr. G. Schuler

Tag der Disputation: 14. Februar 2012

**Meinen Eltern
und Stefan**

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG

2 SCHRIFTTUM

2.1 Allgemeines zu Mutterkorn

2.2 Ergotalkaloide

2.2.1 Struktur

2.2.2 Pharmakologie

2.2.2.1 Metabolisierung und carry over

2.2.2.2 Einfluss auf die Tiergesundheit

2.2.2.3 Medizinische Verwendung in der Humanmedizin und Veterinärmedizin

2.2.3 Vorkommen von Ergotalkaloiden in Süßgräsern (Poaceen)

2.2.3.1 Allgemeines zu Poaceen

2.2.3.2 Endophytische Pilze bei Poaceen

2.2.3.2.1 Taxonomie und Verbreitung

2.2.3.2.2 Ökologische Bedeutung toxinogener Endophyten

2.2.3.2.3 Alkaloide der Gras-Endophyt-Assoziation

2.3 Nachweisverfahren für Ergotalkaloide in Futtergräsern

2.3.1 Histologische Nachweisverfahren für Endophyten

2.3.2 Physikalisch-chemische Nachweisverfahren für Alkaloide

2.3.2.1 Chromatographische Nachweisverfahren

2.3.2.1.1 Dünnschichtchromatographie

2.3.2.1.2 Gaschromatographie

2.3.2.1.3 Flüssigkeitschromatographie

2.3.3 Immunchemische Nachweisverfahren

2.3.3.1 Enzymatische Verfahren zum Nachweis von Ergotalkaloiden in Gräsern

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

- 3.1.2 Puffer und Lösungen
- 3.1.3 Mykotoxine
- 3.1.4 Immunreagenzien
- 3.1.5 Geräte und Hilfsmittel
- 3.1.5.1 Enzymimmuntests
- 3.1.5.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

3.2 Methodik

- 3.2.1 Zeitlicher Versuchsablauf
- 3.2.2 Probennahme
- 3.2.3 Probenvorbereitung
- 3.2.4 Probenextraktion
- 3.2.5 Anwendung der Nachweisverfahren
 - 3.2.5.1 Enzymimmuntests für den Nachweis von Ergotalkaloiden in Futtergräsern
 - 3.2.5.1.1 Probenextraktverdünnungen
 - 3.2.5.1.2 Durchführung des direkten kompetitiven Enzymimmuntests
 - 3.2.5.1.3 Durchführung des indirekten kompetitiven Enzymimmuntests
 - 3.2.5.1.4 Berechnungsgrundlagen
 - 3.2.5.1.5 Bestimmung der Testsensitivität
 - 3.2.5.1.6 Testspezifität
 - 3.2.5.1.7 Bestimmung der Wiederfindung
 - 3.2.5.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographischer Nachweis von Ergotalkaloiden in Futtergräsern
 - 3.2.5.2.1 Probenvorbereitung und Probenextraktion
 - 3.2.5.2.2 Analysebedingungen
 - 3.2.5.2.3 Identifizierung
 - 3.2.5.2.4 Kalibriergerade
 - 3.2.5.2.5 Quantifizierung
 - 3.2.5.2.6 Berechnungsgrundlagen
 - 3.2.5.2.7 Methodenvergleich

3.3 Methodische Auswertungskriterien

4	ERGEBNISSE
4.1	Untersuchungsverfahren
4.1.1	Auswertung der Enzymimmuntests
4.1.2	Testsensitivität und Testspezifität
4.1.3	Wiederfindungsraten
4.2	Ergebnisse der Enzymimmuntests für den Nachweis von Ergotalkaloiden in Futtergräsern
4.2.1	<i>Festuca arundinacea</i>
4.2.2	<i>Lolium perenne</i>
4.2.3	Sonstige <i>Poaceae</i>
4.2.4	Ergotalkaloide in verschiedenen Pflanzengeweben
4.2.4.1	<i>Festuca arundinacea</i>
4.2.4.2	<i>Lolium perenne</i>
4.2.5	Saisonale Belastungssituation
4.2.5.1	<i>Festuca arundinacea</i>
4.2.5.2	<i>Lolium perenne</i>
4.2.6	Regionale Belastungssituation
4.2.6.1	<i>Festuca arundinacea</i>
4.2.6.2	<i>Lolium perenne</i>
4.3	Ergebnisse der Hochdruckflüssigkeitschromatographie für den Nachweis von Ergotalkaloiden in Futtergräsern
4.3.1	<i>Festuca arundinacea</i>
4.3.2	<i>Lolium perenne</i>
4.4	Vergleichende Darstellung der Untersuchungsergebnisse von EIA und HPLC

5	DISKUSSION
5.1	Anwendbarkeit der EIA-Testverfahren
5.2	Methodenvergleich EIA und HPLC für Ergotalkaloide
5.3	Untersuchungen von Gräsern
5.3.1	Vorkommen von Ergotalkaloiden
5.4	Ergotalkaloidbelastung und Endophyten
5.5	Schlussfolgerungen
6	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY
7	LITERATURVERZEICHNIS
8	ANHANG

Liste der verwendeten Abkürzungen

<i>A.</i>	<i>Alopecurus</i>
Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata/Destilliertes Wasser
AG	Aktiengesellschaft
AK	Antikörper
AS	Antiserum
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Kohlenstoff
<i>C.</i>	<i>Claviceps</i>
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CYP	Cytochrom P 450
d	dies (Tag)
<i>D.</i>	<i>Dactylus</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EA	Ergotalkaloid
EFSA	European Food Safety Authority
EG	Europäische Gemeinschaft
EIA	Enzyme Immunoassay (Enzymimmuntest)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
engl.	Englisch
et al.	et alii/und andere Autoren
eV	Elektronenvolt
<i>F.</i>	<i>Festuca</i>
FuMiG	Futtermittelgesetz
FuMiV	Futtermittelverordnung
FWZ	Futterwertzahl
g	Gramm
GC	Gaschromatographie

GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HS	Hemisuccinat
HT	Hydroxytryptophan
Ig	Immunglobulin
Inc.	Incorporated
K	Kaninchen
kg	Kilogramm
KG	Kommanditgesellschaft
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
KGW	Körpergewicht
l	Liter
<i>L.</i>	<i>Lolium</i>
LC	Liquid Chromatography (Flüssigkeitschromatographie)
LSD	Lysergsäurediethylamid
m	Meter
M	Mol
max.	maximal
med. vet.	veterinärmedizinisch
mg	Milligramm
min	Minute
MJ	Megajoule
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Milli-Mol
n	Anzahl
<i>N.</i>	<i>Neotyphodium</i>
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEL	Nettoenergielaktation

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NWG	Nachweisgrenze
<i>P.</i>	<i>Plantago</i>
p. a.	Pro analysi
PBS	Phosphate Buffered Saline (Natriumphosphat-Puffer)
pg	Pikogramm
pH	potential Hydrogenii; negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PJ	Natrium-Perjodat
RT	Raumtemperatur
Schreb.	Schreber
sec	Sekunde
<i>spp.</i>	species pluralis
syn.	synonym
Tab.	Tabelle
TLC	Thin Layer Chromatography
TM	Trockenmasse
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v. H.	vom Hundert
VO	Verordnung
VP	Vegetationsperiode
v/v	Volumen pro Volumen

1 EINLEITUNG

Bezüglich einer Kontamination von Futtergräsern mit Toxinen des Ergolintyps sind prinzipiell zwei Ursachen zu unterscheiden:

1. ein Befall mit Mutterkorn (Ergot),
2. das Vorkommen von toxinogenen endophytischen Pilzen.

Ergotalkaloide sind die toxischen Inhaltsstoffe des Mutterkorns, das als verfestigtes Dauermycel des Feldpilzes *Claviceps purpurea* vorkommt. Ein Befall mit Mutterkorn ist bei mehr als 400 Gramineen möglich (Teuteberg, 1987). Auch Gräser der Familie *Poaceae*, die Futterweiden besiedeln und die Zuwege von Getreidefeldern säumen, können mit *Claviceptacea* infiziert sein und stellen damit eine Infektionsquelle für Getreide dar. Eine Infektion mit *Claviceps spp.* wird dabei sowohl durch feuchte Witterung begünstigt als auch durch den Trend zu pflugloser Bodenbearbeitung, bei der verwelkte Pflanzenteile auf den Feldern verbleiben.

Ausgehend von der Beobachtung, dass Gräser toxische Pilzmetaboliten (Mykotoxine) beeinhalteten, lässt sich eine mutualistische Lebensweise vermuten, bei der die Pflanze dem Pilz einen Lebensraum bietet, der vom Pilz durch die Bildung schützender Mykotoxine aufrechterhalten wird.

Zahlreiche Pilze verbringen ihren gesamten Lebenszyklus endophytisch in lebendem Pflanzengewebe, ohne makroskopisch oder symptomatisch in Erscheinung zu treten. Pilze der Gattung *Neotyphodium* werden von *Festuca arundinacea* und *Lolium perenne* mit Nährstoffen versorgt und durch deren Samen verbreitet. Der positive Einfluss der Endophyten wirkt sich auf die vegetative und generative Entwicklung sowie die Nachwuchsfähigkeit der Gräser aus, da die Toleranz der Wirtspflanze gegenüber biotischen und abiotischen Stressfaktoren erhöht wird. Für Pflanzen zählen auch landwirtschaftliche Nutztiere zu den biotischen Stressfaktoren, daher sind diese Endophyten auch für den Menschen von Bedeutung. Erste detaillierte Studien zu Problemen mit Endophyten wurden in den 1960er Jahren in Zusammenhang mit dem verstärkten Anbau der Rohrschwingelsorte ‚Kentucky 31‘ in den USA notwendig. Endophyten verursachten bei Weidetieren die ‚fescue-toxicosis‘, die zu großen wirtschaftlichen Verlusten führte. Die Symptome der Erkrankung: Gangrän der

Extremitäten, Fertilitätsprobleme, ähnelten einer durch *C. purpurea* hervorgerufenen Ergotalkaloid-Toxikose und wurden mit dem Vorkommen eines endophytisch lebenden Pilzes in Verbindung gebracht (Bacon et al., 1977). Nur wenige Jahre später wurden in Neuseeland neurologische Erscheinungen bei Schafen, die sogenannten ‚perennial ryegrass staggers‘, auf endophytische Toxine zurückgeführt (Fletcher und Harvey, 1981).

Das weltweite Vorkommen infizierter Gräser auf vielen natürlichen Grünlandstandorten führt zu Problemen in der Landwirtschaft und der Tiergesundheit. Vor allem chronische Intoxikationen, verbunden mit unspezifischen Krankheitserscheinungen wie Rückgang der Futteraufnahme, Lebendmassezunahme oder der Milchleistung, belegen die Notwendigkeit routinemäßiger Kontrollen befallener Gräser.

Ziel der in vorliegender Arbeit beschriebenen Untersuchungen war es daher, das Vorkommen und Ausmaß einer möglichen Belastung von Poaceen mit Ergotalkaloiden zu ermitteln, wobei sowohl der Eintrag über Mutterkorn (*Claviceps spp.*) als auch über Endophyten (*Neotyphodium spp.*) geprüft werden sollte. Diese Untersuchungen wurden auch im Hinblick auf die immer noch ungeklärte Frage eines möglichen carry-overs von Ergotalkaloiden bzw. Metaboliten in die Milch laktierender Milchkühe durchgeführt, um einen Beitrag zur Risikoabschätzung zu leisten. Hierbei sollten enzymimmunochemische Verfahren für Ergotalkaloide, die in den letzten Jahren an der Professur für Milchwissenschaften entwickelt worden waren, auf ihre Eignung hin geprüft werden. Die Untersuchungen beziehen sich vorrangig auf die beiden bedeutendsten Leistungsgräser Deutschlands: *L. perenne* und *F. arundinacea*, die zudem die Frage einer Kontamination durch Ergotalkaloide mittels Endophyten aufwerfen (Miles et al., 1996; Cagaš et al., 1999). Zum Nachweis der Toxine wurden erprobte Verfahren evaluiert und optimiert. Die Anwendung erfolgte anhand von künstlich und natürlich kontaminierten Gräserproben.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Allgemeines zu Mutterkorn

Als Mutterkorn (*Secale cornutum*) werden die Sklerotien des Pilzes *Claviceps (C.) purpurea* [Fries] Tulasne bezeichnet. *C. purpurea* gehört taxonomisch in die Klasse der Ascomyceten (Alexopoulos, 1966) und ist der wichtigste Vertreter der Gattung. Das Sklerotium stellt die verfestigte Dauerform des Mutterkornpilzes dar, das sich als dichtes Hyphengeflecht anstatt einer Frucht vor allem in den Ähren von Roggen, seltener auch in Weizen, Gerste, Hafer sowie in Gräsern entwickelt (Mühle und Breuel, 1977; Mielke, 2000).

Der Lebenszyklus des Mutterkornpilzes lässt sich in eine sexuelle und in eine asexuelle Phase gliedern (Mielke, 2000) (Abbildung 1). Die Sklerotien überwintern auf der Bodenoberfläche und im Boden, um im Frühjahr zahlreiche Fruchtkörper (Perithezien) auszubilden (Hofmann, 1964; Alexopoulos, 1966). Während der geschlechtlichen Reifeteilung entwickeln sich Ascosporen, die über den Wind auf die Narben bevorzugt frühblühender Gräser transportiert werden und diese primär infizieren. In der asexuellen Phase keimen die Ascosporen aus und bilden in der Basis des Fruchtknotens ein dichtes Myzel mit Konidien, die nach etwa neun bis dreizehn Tagen über den sogenannten Honigtau nach außen transportiert werden (Mühle und Breuel, 1977). Durch die Verbreitung dieser zuckerhaltigen Flüssigkeit, z.B. durch Insekten, erfolgt eine Ausbreitung der Infektion. Der asexuelle Zyklus des Mutterkorns kann so lange stattfinden, wie infektionsfähige, blühende Pflanzen auf dem Feld vorhanden sind. Im Fruchtknoten entwickelt sich über einen Zeitraum von 10–21 Tagen allmählich das neue Sklerotium.

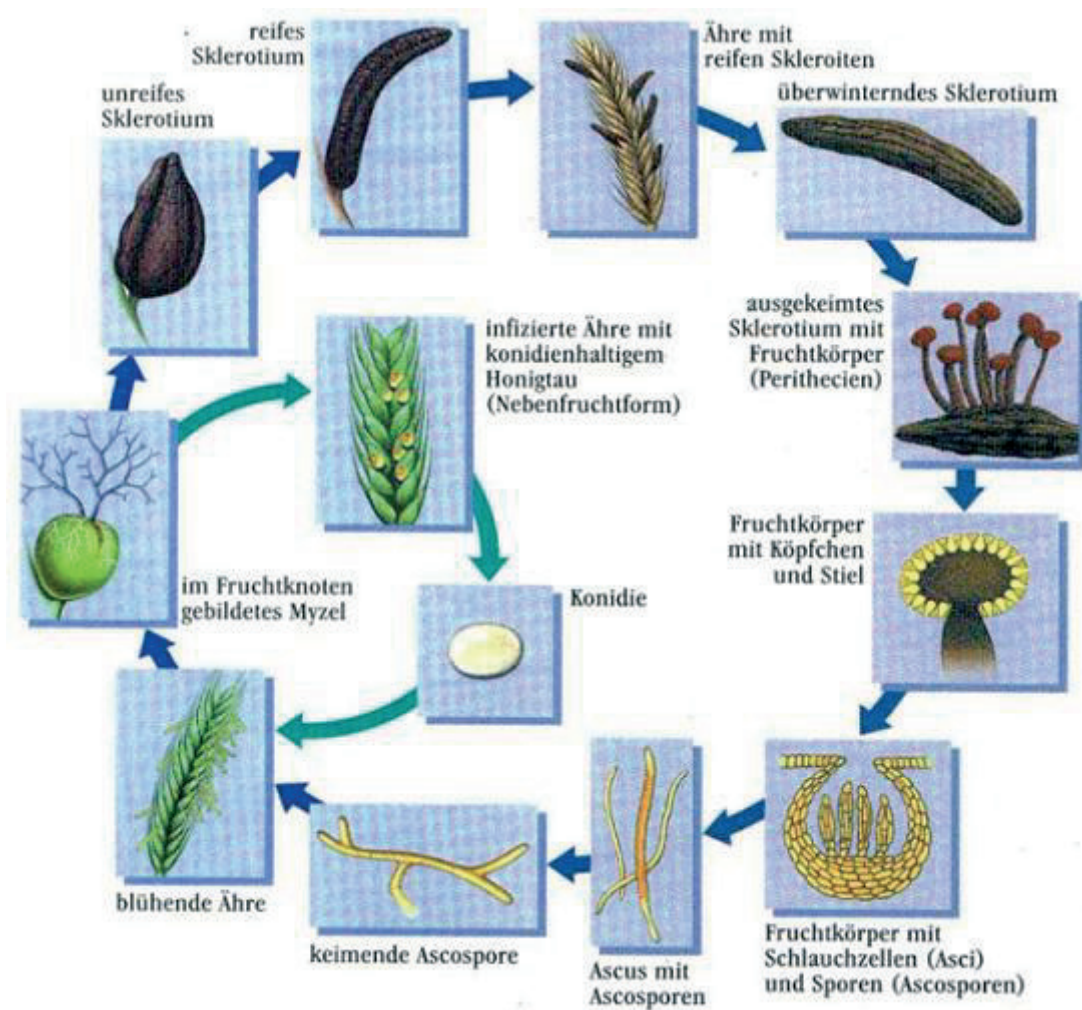


Abb. 1: Mutterkornentwicklungszyklus, entnommen aus der Internetpräsenz der Saaten-Union:
www.saaten-union.de/index.cfm/nav/153/article/2209.html

Die in den Sklerotien enthaltenen Alkaloide rufen mannigfaltige toxische Wirkungen hervor, die den Ergotismus auslösen können. Im Volksmund wurde die Erkrankung auch als „Kribbelkrankheit“, „Heiliges Feuer“ oder „Antonius-Feuer“ bezeichnet, wobei die neurologische Symptomatik als „brennendes“ Gefühl beschrieben wird. Ergotismus manifestiert sich in zwei Hauptformen, der gangränösen (chronischer Ergotismus) und der konvulsiven (akuter Ergotismus) Erscheinungsform (de Costa, 2002). Beim *Ergotismus gangraenosus* treten Symptome wie Gefäßspasmen, Ischämie, Nekrosen und Verlust der Gliedmaßen auf. Der *Ergotismus convulsivus* ist charakterisiert durch Erbrechen, Krämpfe, Halluzinationen und Psychosen. Letztere Symptomatik erlangte nicht zuletzt durch das von Hofmann 1938 hergestellte semisynthetische Halluzinogen Lysergsäurediethylamid (LSD) viele Jahre später zweifelhaften Ruhm (Hofmann, 1964). Die ersten Ergotalkaloid-Derivate wurden 1906 isoliert („Ergotoxin“). Im Jahr 1918 folgte die Isolation von Ergotamin als erstes

Reinalkaloid durch Stoll. Seit 1935 konnte Ergometrin gewonnen und therapeutisch angewendet werden (Eadie, 2003). Bislang wurden mehr als 40 verschiedene Ergotalkaloide aus den Sklerotien von *C. purpurea* isoliert. Mit der Kenntniserweiterung über die Toxizität und Bedeutung von Ergotalkaloiden konnte das epidemische Auftreten des Ergotismus zwar verhindert werden, chronische Aufnahmen von Ergotalkaloiden über mit Mutterkorn kontaminierte Lebens- und Futtermittel sind dennoch Gegenstand einer aktuellen Diskussion der Verbraucher- und Tiergesundheit.

2.2 Ergotalkaloide

2.2.1 Struktur

Entsprechend der Historie der Strukturaufklärung sowie der Gemeinsamkeiten im chemischen Aufbau werden die Alkaloide der Sklerotien von *C. purpurea* auch als Indolalkaloide, Ergotalkaloide oder Ergoline bezeichnet. Sie unterscheiden sich sowohl qualitativ als auch quantitativ in ihrem toxischen Potenzial (Wolff, 1992; Buchta und Cvak, 1999). Ergotalkaloide sind 3,4-substituierte Indolderivate mit einem tetrazyklischen Ergolin-Ringsystem als gemeinsame Grundstruktur (Abb. 2).

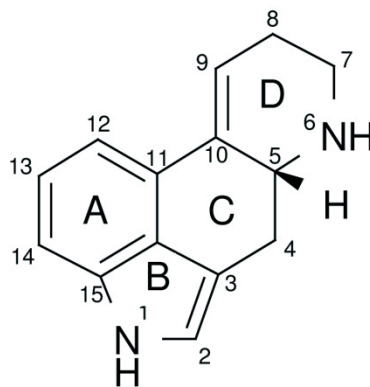
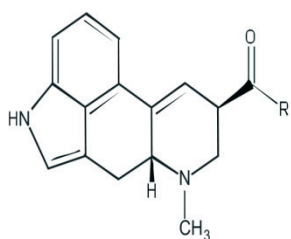


Abb. 2: Grundstruktur der Ergotalkaloide; Tetrazyklisches Ergolin-Ringsystem

In Abhängigkeit von den unterschiedlichen Substituenten des C-8 werden drei Substanzklassen unterschieden: 1. die Clavin-Alkaloide, 2. die Lysergsäurederivate sowie 3. die Peptidalkaloide.

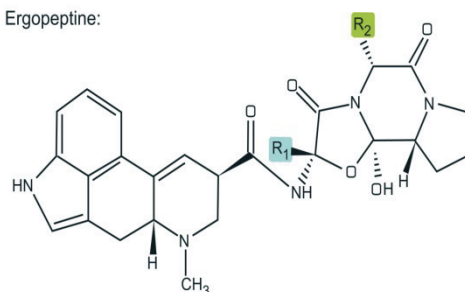
Bei den D-Lysergsäurederivaten befindet sich an C-8 eine Carboxylgruppe, die mit einem Tripeptidrest (Peptidalkaloid), einem aliphatischen Amin (einfache Lysergsäureamide, Abb. 3) oder Ammoniak verbunden ist. Durch die Bindung verschiedener Amide an die Carboxylgruppe der Lysergsäure ist eine Differenzierung der Lysergsäurederivate möglich (Abb. 3), durch die auch deren Löslichkeit in verschiedenen Medien beeinflusst wird. Die Bindung einer Aminogruppe oder von Aminoalkoholen führt dazu, dass das Produkt, z. B. Ergometrin, wasserlöslich ist. Wasserunlösliche Derivate hingegen charakterisieren sich durch zyklische Tripeptide als Substituent (Tabelle 1). Bei den komplexer aufgebauten Peptidalkaloiden befinden sich neben NH_3 und einer α -Ketosäure immer ein variables Peptid sowie eine konstante Aminosäure. Dabei handelt es sich mit Ausnahme des Ergobalansins um L-Prolin. Bei Ergobalansin ist Prolin durch die Aminosäure Alanin ersetzt (Hofmann, 1964). Die strukturell einfachste Gruppe der Clavine besitzt statt der Carboxylgruppe eine Methyl- oder Hydroxymethylgruppe. Im Ring D des tetrazyklischen Grundgerüsts befindet sich meist eine Doppelbindung, das N-Atom in Position 6 ist immer methyliert. Secoergoline besitzen einen offenen D-Ring. Die Grundstruktur der einfachen Lysergsäureamide und der Ergopeptine ist in Abbildung 3 dargestellt.

Einfache Lysergsäure-Amide



$\text{R} = \text{OH}$	Lysergsäure (Grundkörper)
$\text{R} = \text{NH}_2$	Lysergsäureamid
$\text{R} = \text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Lysergsäurediethylamid (LSD)
$\text{R} = \text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$	Ergometrin

Ergopeptine:



$\text{R}_1 = \text{CH}_3$	$\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2)_3$	Ergosin
$\text{R}_1 = \text{CH}_3$	$\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	Ergotamin
$\text{R}_1 = \text{C}_2\text{H}_5$	$\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	Ergostin
$\text{R}_1 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$	$\text{R}_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$	Ergocomin
$\text{R}_1 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$	$\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	α -Ergocryptin
$\text{R}_1 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$	$\text{R}_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5$	β -Ergocryptin
$\text{R}_1 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$	$\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	Ergocristin

Abb. 3: Struktur einfacher Lysergsäureamide und Ergopeptine (nach BöS, 2000)

Tab. 1: „Periodisches System der Ergotalkaloide“, modifiziert nach Hofmann (1964)

Untergruppe	Alkaloid	Pepidteil besteht aus		Summenformel	
Ergotamin- gruppe	Ergotamin	L-Prolin	α -Hydroxyalanin	L-Phenylalanin	C33H35N5O5
	Ergosin			L-Leucin	C30H37N5O5
	Ergovalin			L-Valin	C29H35N5O5
Ergotoxin- gruppe	Ergocristin		α -Hydroxyvalin	L-Phenylalanin	C35H39N5O5
	Ergocryptin			L-Leucin	C32H41N5O5
	Ergocornin			L-Valin	C31H39N5O5
Ergoxin- gruppe	Ergostin		α -Hydroxy- α - Aminobuttersäure	L-Phenylalanin	C34H37N5O5
	Ergoptin			L-Leucin	C31H39N5O5
	Ergonin			L-Valin	C30H37N5O5

Aufgrund der Stereoisomerie an C5-und C8-Atom in Ring D der Lysergsäure treten die rechtsdrehende D-Lysergsäure und die linksdrehende L-Lysergsäure auf. Durch Isomerisierung an C8 der Lysergsäure entsteht die D-/L-Isolysergsäure. Die meisten Alkaloide können die biologisch weniger aktiven Isomere (*-inine*) formen (8S 5R), dann besteht das Grundgerüst aus Isolysergsäure, und ebenso leicht in die isomere Ursprungsform (*-ine*) zurückfinden, dann liegt Lysergsäure vor (Buchta und Cvak, 1999). Nachfolgend sind bedeutende Ergotalkaloide und deren physikalisch-chemische Eigenschaften aufgeführt (Abb. 4).

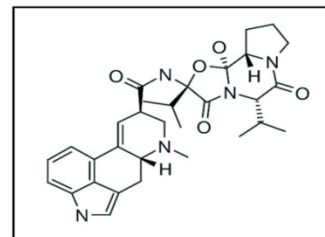
Ergocornin

Molekulargewicht: 561,64 g/mol

Schmelzpunkt: 182- 184 °C

Summenformel: $C_{31}H_{39}N_5O_5$

Strukturformel:

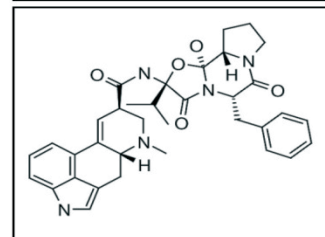
**Ergocristin**

Molekulargewicht: 609,70 g/mol

Schmelzpunkt: 160-170 °C

Summenformel: $C_{35}H_{39}N_5O_5$

Strukturformel:

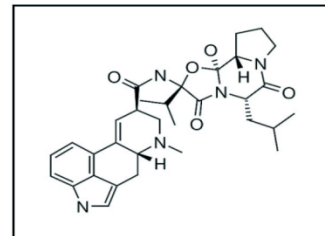
**α- Ergocryptin**

Molekulargewicht: 575,72 g/mol

Schmelzpunkt: 212 °C

Summenformel: $C_{32}H_{41}N_5O_5$

Strukturformel:

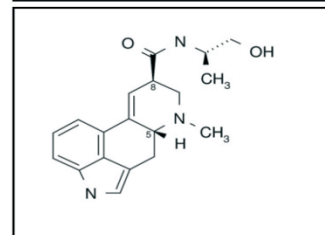
**Ergometrin** (syn. Ergonovin, Ergobasin):

Molekulargewicht: 325,40 g/mol

Schmelzpunkt: 190-200 °C

Summenformel: $C_{19}H_{23}N_3O_2$

Strukturformel:

**Ergotamin**

Molekulargewicht: 581,65 g/mol

Schmelzpunkt: 210-214 °C (dec.)

Summenformel: $C_{33}H_{35}N_5O_5$

Strukturformel:

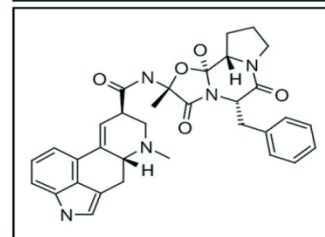


Abb. 4: Chemische Eigenschaften einiger wichtiger Ergotalkaloide (nach Roth, Frank und Kormann, 1990)

In Untersuchungen zur Biosynthese der Alkaloide wurden die Mevalonsäure und das L-Tryptophan als Ausgangssubstanzen für die Synthese des Ergolinringsystems nachgewiesen

(Mühle und Breuel, 1977). Durch enzymatische Reaktion wird Tryptophan zu 4-Dimethylallyltryptophan isoprenyliert. Diese Reaktion gilt als der erste entscheidende Schritt in der Alkaloidsynthese (Mantle und Waight, 1968). Die darauffolgenden enzymatischen Schritte beziehen sich auf den Aufbau und die Umgestaltung der Ringe C und D des Ergolinringgerüsts. Weitere Oxidationsreaktionen führen dann zur Lysergsäure, welche die Basis für die einfachen Lysergsäureverbindungen und die Peptidalkaloide darstellt (Mühle und Breuel, 1977). Der weitere Verlauf der Biosynthese von der D-Lysergsäure zu den Ergopeptinen erfolgt nichtribosomal über eine schrittweise Verknüpfung von Peptidzwischenstufen zu einer Peptidkette (Riederer et al., 1996; Walzel et al., 1997).

2.2.2 Pharmakologie

Das große pharmakologische Wirkungsspektrum der Ergotalkaloide lässt sich einerseits durch ihre strukturelle Diversität und andererseits durch die unterschiedlichen Affinitäten des Ergolinringsystems auf Rezeptoren der Neurotransmitter Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin und Serotonin erklären (Forth et al., 2001) (Abb. 5). Ergotalkaloide können an diesen Rezeptoren partiell agonistische oder antagonistische Wirkungen zeigen (Starke, 2001).

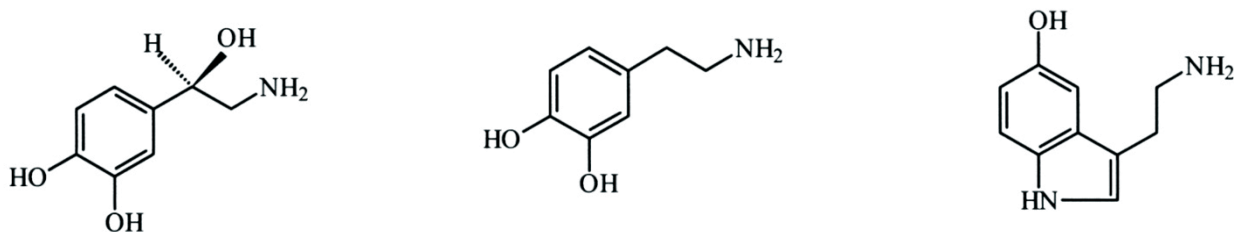


Abb. 5: Strukturelle Ähnlichkeiten des Ergolinringsystems zu den Neurotransmittern Dopamin, Noradrenalin und Serotonin

Alkaloide des Ergopeptintyps zeichnen sich besonders durch Affinitäten zu adrenergen α -Rezeptoren aus und rufen sympathomimetisch-vasokonstriktorische Effekte hervor (Hofmann, 1978). Einfache Lysergsäurederivate und Clavine hingegen besitzen eine geringere adrenerge Komponente, weisen aber eine Affinität zu Serotonin-(5-HT)-Rezeptoren auf (Forth et al., 2001).

Bereits wenige Strukturveränderungen am Ergolinring oder an dem Substituenten des C8-Atoms verursachen Unterschiede in der biologischen Aktivität der Verbindung. Beispielsweise wird 2-Bromo-ergocryptin aufgrund seiner dopaminergen Wirkung sowohl in der Therapie des Morbus Parkinson als auch bei Erkrankungen, die durch Hyperprolaktinämie bedingt sind, eingesetzt (Kobel und Sanglier, 1986; Forth et al., 2001).

2.2.2.1 Metabolisierung und carry-over

Nach oraler Aufnahme der Ergotalkaloide werden diese im Magen angesäuert und anschließend im Duodenum absorbiert (Eckert et al., 1978). Bei Rindern wurde die postruminale Absorption von Ergotalkaloiden beschrieben (Westendorf et al., 1993). Ergopeptidalkaloide, wie z. B. das Ergovalin, können durch die Pansenflora der Wiederkäuer zudem mittels Spaltung der Peptide oder Transformation von Prolin innerhalb des Peptidstückes zu einfacheren Alkaloidformen übertragen werden (Eckert et al., 1978). Daher wird vermutet, dass sich im Pansen eine Mischung von Alkaloiden und Alkaloidderivaten befindet (Stuedemann et al., 1998).

Aellig und Nüesch (1977) zufolge beträgt die durchschnittliche orale Absorption von Ergotamin 66 %. Die Bioverfügbarkeit von Ergotamin hingegen liegt mit weniger als 2 % (Aellig und Nüesch, 1977; Ibraheem et al., 1983; Tfelt-Hansen et al., 1995) deutlich unterhalb des Absorptionswertes, da Ergotamin dem first-pass-Metabolismus der Leber unterliegt. Ergometrinmaleat besitzt eine orale Bioverfügbarkeit von 80 %. Sie unterliegt jedoch großer interindividueller Streuung (EMA, 1999). Nach Hill (2005) erreichen Lysergsäureamide und Nicergolin bei gleicher oraler Dosierung einen 20-fach höheren Plasmaspiegel als Ergopeptinalkaloide. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass diese Alkaloide im Vergleich zu Ergopeptinalkaloiden eine höhere Bioverfügbarkeit besitzen und damit auch ein größeres toxisches Potenzial. Eckert et al. (1978) beschrieben für die Lysergsäure/Lysergsäurederivate eine höhere Bioverfügbarkeit als für Ergopeptide und eine geringere Bioverfügbarkeit als für Nicergolin und Methergolin.

Den Metabolismus von Ergotamin untersuchten Moubarak et al. (2002). Die Autoren zeigten, dass in den Mikrosomen von Rinderleberzellen CYP3A-Cytochrome mittels zweifacher Hydroxylierung dazu befähigt sind, Metabolite des Ergotalkaloids zu synthetisieren. Die Metabolisierung erfolgte in Abhängigkeit von vorhandenem NADPH bzw. vom NADPH-

produzierenden System. Tfelt-Hansen et al. (1995) bezeichneten die biologische Aktivität von gebildeten Alkaloidmetaboliten als wahrscheinlich. Peyronneau et al. (1994) beschrieben außerdem einen Zusammenhang zwischen dem Stoffwechsel von Ergocryptin und P-450 Oxigenasen. In einer weiteren Studie von Moubarak et al. (2002) wurde der Einfluss von Ergonovin und Dihydroergotamin auf den Lebermetabolismus von Ratten untersucht. Den Versuchstieren wurden jeweils 100mM der Substanzen über einen Zeitraum von vier Tagen intraperitoneal appliziert. Es wurde keine zusätzliche CYP3A-Cytochrom-Aktivität festgestellt (Moubarak et al., 2002).

Die Ausscheidung der Ergopeptine und der Lysergsäurediethylamide erfolgt hauptsächlich über die Gallenflüssigkeit (Nimmerfall und Rosenthaler, 1976; Eckert et al., 1978). Eckert et al. (1978) stellten den Zusammenhang zwischen dem Exkretionsweg von Ergotalkaloiden und ihrem spezifischen Molekulargewicht dar. Mit Ausnahme von Lysergsäurediethylamid werden Ergotalkaloide mit einem Molekulargewicht unter 350 über die renalen Tubuli mit dem Urin ausgeschieden. Liegt das Molekulargewicht zwischen 350 und 450 findet die Exkretion meist über Urin und Galle statt. Ergotalkaloide, die ein Molekulargewicht größer 450 besitzen, werden ausschließlich über die Galle eliminiert und mit dem Fäzes ausgeschieden. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse einer Fütterungsstudie an Schafen dargestellt (De Lorme et al., 2007). Die Studie umfasste zwei 28-tägige Fütterungsperioden mit *N. coenophialum* infiziertem *F. arundinacea* Stroh (0,610 mg/kg Ergovalin). Ergovalin wurde im Urin nicht nachgewiesen. Es ergaben sich Hinweise darauf, dass zumindest ein Teil des Ergovalins in Lysergsäure umgewandelt und als solches ausgeschieden wird (Tabelle 2).

Tab. 2: Mengenzufluss von Ergovalin und Lysergsäure bei Hammeln¹ nach endophyteninfizierter *F. arundinacea* Fütterung (nach De Lorme et al., 2007)

Messgröße	Ergovalin	Lysergsäure	Ergovalin + Lysergsäure
Aufnahme (µmol/d)	1,15	0,15	1,37
Ausscheidung ² (µmol/d)	0,41	0,38	0,79
Urin	kN	0,21	0,21
Fäzes	0,41	0,17	0,58
Scheinbare Verdaulichkeit (%)	64,2	-12,5	50,4
Ausscheidung (% der Aufnahme)	35,4	248	60,5

¹ n= 6, ²Urin und Fäzes, kN = kein Nachweis

Aufgrund des Fehlens entsprechender Untersuchungen lässt sich über die Frage eines möglichen Übergangs von Ergotalkaloiden oder deren Metaboliten in tierische Gewebe oder in die Milch keine sicheren Aussagen treffen (EFSA, 2005).

Studien über mögliche Übergänge des Toxins in das Gewebe von Schweinen wurden von Whittemore et al. 1976 und 1977 durchgeführt. Nach Fütterung von gemahlenen Sklerotien (30% Ergotoxin, 20 % Ergotamin, 30 % Ergosin, 20% sonstige Ergotalkaloide) konnten keine Rückstände im Gewebe festgestellt werden. Mainka et al. (2007) fütterten ausgewachsene Schweine mit 1 g Ergot/kg KGW bzw. mit 10 g Ergot/kg KGW. Übergänge von Toxinen in das Gewebe wurden nicht festgestellt. Auch in Serum, Gallenflüssigkeit, Lebergewebe und Rücken Fett wurden keine Ergotalkaloide nachgewiesen (Mainka et. al, 2007).

In einer Fütterungsstudie mit Geflügel von Young und Marquardt (1982) wurden an die Tiere verschieden hohe Konzentrationen an Ergotamin-Tartrat verfüttert. Rückstände im Gewebe konnten nur für die höchste Konzentration (810 mg Ergotamin/kg Futter) ermittelt werden: 5 µg/kg im Muskel und 4 µg/kg in der Leber. Ein mögliches Vorkommen von Ergotamin-Metaboliten im Gewebe wurde von den Autoren nicht ausgeschlossen.

Einige Autoren überprüften einen möglichen Übergang von Ergotalkaloiden in die Milch. Wolff et al. (1995) verfütterten 3 µg Ergotalkaloide/kg KGW über zwei Wochen an Milchkühe, entsprechend einer Gesamtkonzentration von 1.835 µg/Milchkuh/Tag. Es wurden keine Rückstände in der Milch gefunden. Eine andere Studie an Milchkühen ergab eine Kontamination von Milch mit bis zu 0,086 mg/l Gesamtalkaloidkonzentration, nachdem 50 g Sklerotien pro Tier aufgenommen wurden (Wolff et al., 1995). Realini et al. (2005) untersuchten bei 14 Rindern einen Übergang von Ergotalkaloiden in Fleisch, genaue Daten über die Alkaloidaufnahme fehlen jedoch.

2.2.2.2 Einfluss auf die Tiergesundheit

Prinzipiell sind alle Haustierarten in unterschiedlichem Ausmaß für eine Mutterkornvergiftung empfänglich. In Tabelle 3 sind charakteristische Symptome des Ergotismus bei ausgewählten Nutztierarten aufgeführt. Hierbei sind sowohl der durch Mutterkorn ausgelöste klassische Ergotismus zu berücksichtigen, als auch Krankheitsbilder, die durch Ergotalkaloid-bildende endophytisch lebende Pilze in Gräsern verursacht werden,

z.B. die „fescue toxicosis“.

Tab. 3: Subklinische und klinische Symptome des Ergotismus bei Nutztieren

Spezies	Symptom	Referenz
Rind	Lahmheit, Anorexie, verminderte Milchleistung und Gewichtszunahme, herabgesetzte Konzeptionsrate, Hyperventilation, Hyperthermie, Hypersalivation, Akren- und Zungennekrose, „fescue toxicosis“	Schmidt und Osborn, 1993; Paterson et al., 1995; Stuedemann et al., 1998; Botha et al., 2004
Schaf	Lahmheit, Ödeme der Gliedmaßen und des Schwanzes, Inappetenz, Pulsus frequens	Spratling, 1972; Loken, 1984; McLeay et al., 2002
Schwein	Leistungsminderung, Agalaktie, Aborte, Geburt lebensschwacher Ferkel	Barnikol et al., 1982; Digneau et al., 1986; Richter et al., 1989; Oresanya et al., 2003
Pferd	Verlängerte Trächtigkeit, Dystokie, Agalaktie, Geburt lebensschwacher und dysmaturer Fohlen	Monroe et al., 1988; Riet-Correa et al., 1988; Cross et al., 1995
Geflügel	Verminderte Futteraufnahme, Leistungsminderung, Nekrose der Zehen, des Schnabels und des Hahnenkamms	Young und Marquardt, 1982; Rotter et al., 1985

Viele Ergotalkaloide weisen vasokonstriktische Eigenschaften auf, das Ergotamin gilt jedoch als die am stärksten vasokonstriktisch wirksame Substanz (Guggisberg, 1954; Tfelt-Hansen et al., 1995). Infolge der Blutzirkulationsstörung entstehen Thrombosen, die im weiteren Verlauf zu ischämischen Nekrosen vor allem peripher gelegener Bereiche (Akren, Ohr- und Schwanzspitzen, Kamm, Kehllappen) führen (Tfelt-Hansen et al., 1995; Dahme und Weiss, 1999). Ergometrin und Ergotamin besitzen eine direkte stimulatorische Wirkung auf die glatte Muskulatur und können dadurch Uteruskontraktionen auslösen, die wiederum zu Aborten bzw. zu Schwierigkeiten während der Trächtigkeit führen können (Saameli, 1978). Aufgrund der Wirkung von Alkaloiden als Dopaminagonisten entwickeln sich ausgehend von einer gehemmten Prolaktinfreisetzung aus der Hypophyse (Forth et al., 2001)-vor allem beim Schwein Agalaktien. Nach Barnikol et al. (1982) sind diese Agalaktien insbesondere auf

Ergotamin und Ergocornin zurückzuführen. Einige Ergotalkaloide wirken ähnlich wie biogene Amine und beeinflussen als solche die Neurotransmission. In diesem Zusammenhang wurden die charakteristischen Merkmale des *Ergotismus convulsivus* beobachtet (Rolle und Mayr, 2002).

Woods et al. (1966) beschrieben Anorexien, Speicheln und Hyperventilationen bei Rindern nach täglicher oraler Gabe von Ergotamin in Höhe von 1mg/kg KGW. Vier von sechs Tieren verstarben innerhalb der ersten zehn Tage. Postmortale Untersuchungen von besonders schwer erkrankten Rindern ergaben entzündliche Veränderungen des Darms. Rinder die mit Ergovalin- und Ergopeptid-haltigem Gras gefüttert wurden, zeigten charakteristische Symptome einer Ergotalkaloidtoxikose, die mit Lahmheiten und Gangränen der Extremitäten und des Schwanzes (Botha et al., 2004) einhergingen. Nach intravenöser Injektion von 5-7mg Ergotamintartrat bzw. Ergonovinnmaleat zeigten Färsen in Untersuchungen von Browning und Leite-Browning (1997) verminderte Hauttemperaturen, Herzfrequenzen und Prolaktinkonzentrationen im Serum sowie eine Erhöhung der Respirationsrate und des Blutdrucks. Hyperthermien wurden nach Fütterung von endophyteninfizierten *F. arundinacea* Gräsern bei Stieren beobachtet (Browning 2004). Für Afrika ist ein Ausbruch der ‚fescue toxicosis‘ bei Wiederkäuern infolge der Aufnahme endophyteninfizierter Gräser beschrieben (Botha et al., 2004). Eine Rinderherde graste über drei Wochen auf mit *F. eliator* besiedeltem Weideland. Von 385 Tieren zeigten anschließend 50 Lahmheitssymptome und/oder Nekrosen am Schwanz. Die Untersuchung der Gräser ergab Ergovalinkonzentrationen im Bereich von 1.720–8.170 µg/kg der Trockenmasse (Botha et al., 2004).

Ergotalkaloidvergiftungen bei Pferden entstehen im Wesentlichen durch die Aufnahme von mit *Neotyphodium spp.* infizierten Futtergräsern. Sie betreffen vorrangig gravide Stuten und Fohlen (Tab. 3). Im Gegensatz zur klinischen Symptomatik bei Rindern entwickeln gravide Stuten unter Toxineinwirkung keinen Anstieg der Körpertemperatur (Monroe et al., 1988). Agalaktien werden hingegen beschrieben und resultieren ebenfalls aus einer verminderten Prolaktin-Sekretion im Serum (Cross et al., 1995). Fayrer-Hosken et al. (2008) untersuchten den Zusammenhang zwischen über das Futtergras aufgenommenen Ergotalkaloiden und möglichem verminderten Ejakulatvolumen beim Hengst. Die Autoren werteten die Spermatogramme von sechs Zuchthengsten bezüglich der Motilität, Anzahl und Morphologie der Spermien aus, fanden jedoch keine Hinweise auf Unterschiede zu den Kontrollen.

2.2.2.3 Medizinische Verwendung in der Humanmedizin und Veterinärmedizin

Das breite Spektrum an biologischer Aktivität der Ergotalkaloide spiegelt sich auch in ihrer Funktion als strukturelles Vorbild für neue Arzneistoffe wider (Mantegani et al., 1999; Haarmann et al., 2006). Im medizinischen Alltag finden diverse natürliche und synthetische Ergotalkaloide Anwendung. Ergometrin und Ergotamin werden wie natürlich gewonnen eingesetzt. Chemisch abgewandelt kommen aber unter anderem der Wirkstoff Dihydroergotamin oder das Methysergid, beispielsweise in der Migränetherapie/-prophylaxe, zum Einsatz. Die pharmazeutische Forschung beschäftigt sich darüber hinaus auch mit der Möglichkeit von Voll-Synthesen. Pharmakologisch bedeutsame natürliche Ergotverbindungen bzw. deren synthetische Analoga und ihre Anwendung sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Ergotalkaloide sowie davon abgeleitete halbsynthetische Arzneistoffe und ihre therapeutische Anwendung

Wirkstoff	Indikation	Referenz
Ergotamin Dihydroergotamin	Akute Migräne, Migräneprophylaxe	Tfelt-Hansen et al., 2000; Goadsby, 2003
Ergometrin	Postpartale Blutungen	Chong et al., 2004; De Costa, 2002
Cabergolin	Hyperprolaktinämie, Morbus Parkinson, Restless-Leg-Syndrom, Akromegalie	Biermasz et al., 2005; Barlier und Jaquet, 2006
Bromocriptin	Hyperprolaktinämie, Morbus Parkinson, Gynäktomastie, Lactatio falsa, Rheumatoide Arthritis	Grünau et al., 1996; McMurray, 2001; Barlier und Jaquet, 2006
Nicergolin	Altersdemenz, Hirnleistungsstörungen	Fioravanti und Flicker, 2001
Pergolid	Morbus Parkinson, Restless-Leg-Syndrom	Happe und Trenkwalder, 2004

2.2.3 Vorkommen von Ergotalkaloiden in Süßgräsern (Poaceen)

2.2.3.1 Allgemeines zu Poaceen

Die umgangssprachliche Verwendung des Begriffs „Gras“ bezieht sich vorwiegend auf die Wuchsform, wobei die schmalen Blätter ebenso bestimmendes Merkmal sind wie der Standort der Gewächse in Rasen und Wiese. Die scheinbare Undifferenziertheit und Gleichförmigkeit, mit der sich Gräser dem Betrachter in der Natur zeigen, manifestierte sich in einer erst im 18. Jahrhundert beginnenden Eingruppierung in das Pflanzenreich: die Ordnung der Grasartigen (*Poales*) mit der einzigen Familie Süßgräser (*Pocaceae*), die Ordnung der Riedgrasartigen (*Cyperales*) mit der einzigen Familie Riedgrasgewächse (*Cyperaceae*) sowie die Binsengewächse (Ordnung *Juncales*) mit der Familie *Juncaceae* (Aichele und Schwegler, 1998; Strasburger, 2008).

Mit etwa 4.000 Arten gehören die Süßgräser zu den größten Familien im Pflanzenreich (Aichele und Schwegler, 1998). Die Süßgräser *F. arundinacea* (Rohrschwengel) und *L. perenne* (Deutsches Weidelgras) stehen im Mittelpunkt der vorliegenden Untersuchung. Ihre morphologischen Merkmale und charakteristischen Eigenschaften werden im Folgenden aufgeführt:

Lolium perenne

Das Deutsche Weidelgras, engl. „perennial ryegrass“, wird auch als „Ausdauernder Lolch“, „Ausdauerndes Weidelgras“ oder „Englisches Raygras“ bezeichnet (Hubbard, 1985; Conert, 1998). Weltweit verbreitet, wächst es in Deutschland häufig auf Wiesen, Weiden und Parkrasen, Wegrändern und Brachen. Eine endgültige taxonomische Einordnung wird noch diskutiert (Moser und Hoveland, 1996). *L. perenne* besitzt 8–90 cm hohe Halme und bis zu 1 m tiefe Verwurzelungen. Die Blütezeit liegt zwischen Mai und August. Die Verbreitung der Grassamen erfolgt vor allem durch Wind oder Tiere, aber auch durch Trittverbreitung durch den Menschen.

In Deutschland sind über 100 Futtergrassorten von *L. perenne* zugelassen (Bundessortenamt, 1999). Es stellt sowohl frisch als auch als Heu eine hochwertige Futterpflanze dar und erreicht in der Futterwerteskala für Gräser den höchsten Wert (FWZ = 8) (Seybold et al., 1998). Nach Baldioli (1995) enthält 1 kg Trockensubstanz 6,2–6,5 MJ Nettoenergielaktation (NEL), 18–22 % Rohprotein und 20–22 % Rohfaser. *L. perenne* ist zudem überaus trittfest und zeigt sich

widerstandsfähig gegen häufigen Verbiss. Folglich stellt es auf Dauergrünland und im Feldfutterbau die für die Futternutzung wichtigste Grasart dar. *L. perenne* geht mit verschiedenen Pilzarten mutualistische Assoziationen ein. Von besonderer wirtschaftlicher und ökologischer Bedeutung ist die Symbiose zwischen *L. perenne* und endophytischen Pilzen (*Neotyphodium spp.*).



Abb. 6: *L. perenne* mit sichtbarem Mutterkornbefall (eigene Aufnahme)

Festuca arundinacea

Der Rohrschwingel (*Festuca arundinacea* Schreb.), engl. „tall fescue“, zählt zur Artengruppe der Wiesenschwingel und wird gelegentlich noch unter den älteren Synonymen *F. Elatior spp. arundinacea* geführt (Conert, 1998). Untersuchungen der DNA belegen enge Verwandtschaften zur Gattung *Lolium*, nach Jauhar (1993) trennen die beiden Gattungen möglicherweise nur Spontanmutationen, die den Blütenstand von einer Rispe in eine Ähre verwandeln. Die Art ist in Deutschland urwüchsig. Sie findet sich in niedrigen, feuchten

Wiesen, aber in ganz Europa, Nordafrika und Nordamerika. Rohrschwengel besitzt eine maximale Höhe von 150 cm. Charakteristisch ist der glatte Halm unterhalb der Rispe. Die Blütezeit liegt zwischen Mai und September. Als C3-Gräser zeichnen sich alle *Festucoideae* durch ihren hohen Proteinwert und ihre hervorragende Verdaulichkeit aus (Moser und Hoveland, 1996). Für die Weide- und Futternutzung ist der Rohrschwengel dennoch nur begrenzt geeignet. Dies kommt auch in der geringen Futterwertzahl (FWZ = 4) zum Ausdruck. Die zähen Blätter von *F. arundinacea* werden vom Weidevieh nur ungern gefressen, eine frühe Mahd begünstigt aber die Eignung als Heu (Lacefield et al., 2003). In den USA stellt *F. arundinacea* ungeachtet dessen ein bedeutendes Futtergras dar. Besonderer Einfluss kommt einer der ältesten Schwingelsorten, „Kentucky 31“, zu. Die historische Bedeutung des Grases liegt in seiner Lebensgemeinschaft mit dem Pilz *N. coenophialum*.



Abb. 7: *F. arundinacea* mit sichtbarem Mutterkornbefall (eigene Aufnahme)

2.2.3.2 Endophytische Pilze bei Poaceen

2.2.3.2.1 Taxonomie und Verbreitung

Endophyten sind Lebewesen, meist Bakterien oder Pilze, die ihren Lebenszyklus vollständig oder teilweise in lebendem Pflanzengewebe verbringen (Petrini, 1991). Erste Erwähnungen der Organismen erfolgten bereits im Jahr 1898 durch Vogl. Er beobachtete Auffälligkeiten zwischen dem Endosperm und der Aleuronschicht in Spelzfrüchten von *L. temulentum*, charakterisierte diese als Pilz und folgerte daraus, dass der Pilz die Ursache für die Giftigkeit des Taumellolches sei. Weitere Untersuchungen bewiesen, dass der Pilz interzellulär in den Sprosssteilen der Pflanze wächst und eine Übertragung lediglich über die Samen der Wirtspflanze ermöglicht wird (Vogl, 1898). Neubauer stellte 1902 die Vermutung auf, dass entdeckte Hyphengeflechte in Spelzfrüchten von *L. perenne* deren Toxizität anzeigten, während er pilzfreie Pflanzen als ungiftig einstufte. Als im Südwesten der USA und in Neuseeland Weidetiertoxikosen auftraten, die mit der Aufnahme endophyteninfizierter Gräser der Familie *Poaceae* in Zusammenhang standen, konzentrierten sich die Studien verstärkt auf Endophyten (Hoveland et al., 1983) und die Erforschung ihrer ökologischen Nutzungsmöglichkeiten (Clay, 1988).

Für die vorliegende Arbeit sind die Endophyten von *L. perenne* und *F. arundinacea* von Bedeutung. Zunächst der Gattung *Acremonium* zugeordnet (Morgan-Jones und Gams, 1982), führten molekularbiologische Untersuchungen von Glenn et al. (1996) zu einer Neuklassifikation in die Gattung *Neotyphodium*. Endophyten der Gattung *Neotyphodium* besiedeln ein enges Wirtsspektrum, wobei jede Spezies auf eine Grasart oder -gattung spezialisiert ist. In der Natur infiziert *N. lolii* *L. perenne* (Paterson et al., 1995) und *N. coenophialum* ist mit seinem Wirt *F. arundinacea* assoziiert (Clay und Schardl, 2002). *Neotyphodium lolii* und *N. coenophialum* verursachen bei *L. perenne* und *F. arundinacea* symptomlose Infektionen von gesundem Pflanzengewebe. Makroskopisch ist ein Erkennen der Infektion nicht möglich (Hesse et al., 2000). Der Pilz wächst interzellulär in den oberirdischen Pflanzenorganen (Clay und Schardl, 2002) und bildet dort langgestreckte Myzelstränge. *Neotyphodium*-Endophyten sind weltweit verbreitet. Insbesondere neuseeländisches Weideland besteht überwiegend aus *L. perenne*-Gräsern (Galey et al., 1991; Easton und Tapper, 2005; Reed et al., 2005), die vor allem auf älteren Weiden stark endophytenbesiedelt sind (Latch und Christensen, 1982). In Australien weisen *L. perenne*-Weiden Infektionen mit *N. lolii* auf, während Futtersorten auf der Basis von *F. arundinacea*

überwiegend als endophytenfrei gelten (Reed et al., 2000). Bacon und Siegel (1988) sprechen den USA und Kanada zu 50–100 % mit *N. coenophialum* infizierte Rohrschwengelweiden zu.

In Europa sind auf natürlichen Graslandstandorten häufig endophytenbesiedelte *L. perenne* und *Festuca*-Ökotypen zu finden (Eggstein, 1997; Lewis et al., 1997; Oldenburg, 1997). In Nordspanien wurde der Ergovalingehalt wilder *L. perenne*-Ökotypen bestimmt (Zabalgogeoazcoa und Bony, 2005). Der Anteil der mit *Neotyphodium* infizierten Pflanzen betrug 40 %, der durchschnittliche Ergovalingehalt ergab 13,5 µg/g. Nach Oldenburg (1994) sind 87 % der untersuchten Wildgraspopulationen Deutschlands endophytenbesiedelt. Die Autorin sammelte Ökotyppopulationen von *L. perenne* von älteren Grünlandstandorten. In 33 von 38 untersuchten Populationen entdeckte sie Infektionen mit *Neotyphodium*. Die Häufigkeit einzelner infizierter Pflanzen innerhalb der verschiedenen Populationen differierte dabei von 1–30 %.

2.2.3.2.2 Ökologische Bedeutung toxinogener Endophyten

Die Rolle endophytischer Schimmelpilze bzw. die Frage, ob hier ein parasitärer oder symbiontischer Zustand vorliegt, ist letztlich noch weitgehend ungeklärt. Verschiedene Autoren vertraten jedoch die Auffassung, dass es sich bei der Beziehung zwischen Endophyten und ihren Wirtsgräsern um einen Mutualismus handelt (Siegel et al., 1987; Clay, 1988). Der Pilz wird von der Pflanze mit Nährstoffen versorgt (Hesse et al., 2000). Als obligat biotropher Organismus ist er auf ihre Koexistenz angewiesen. Seinerseits beeinflusst auch der endogene Symbiont seinen Wirt vorteilhaft (Eggstein, 1997). Vergleicht man infizierte mit nichtinfizierten Pflanzen, so weisen infizierte Pflanzen deutliche Konkurrenzvorteile auf: eine erhöhte Herbivorenresistenz gegenüber Säugern und Insekten, eine erhöhte Toleranz gegenüber abiotischen Stressfaktoren sowie eine verbesserte Nachwuchsfähigkeit (Ravel et al., 1995; Eggstein, 1997).

Die Herbivorenresistenz von mit *N. lolii* infiziertem *L. perenne* ist aus zahlreichen Studien bekannt (Clay, 1991; Hoveland, 1993). Sie wird besonders auf sekundäre Pflanzenstoffe zurückgeführt: Ergotalkaloide, Neurotoxine, Peramin und gesättigte Aminopyrrolizidine. Auch gegenüber Insekten und Nematoden scheinen die Endophyten wirksam zu sein (Latch, 1993). Dabei ist besonders die Wirkung der Loline von Bedeutung (Bush und Schmidt, 1994). Die gesteigerte Toleranz gegenüber abiotischen Stressfaktoren zeigt sich insbesondere am

Beispiel der Trockenheit. Diese wurde fast ausschließlich am infizierten Rohrschwingel untersucht. Infizierte Gräser hatten bei langanhaltender Trockenheit ein besseres Ausdauer- und Wuchsvermögen (Bacon, 1993; West et al., 1993). Der Pilzsymbiont ermöglicht der Pflanze das Aufrechterhalten des Turgordrucks durch die Einlagerung osmotisch wirksamer Substanzen (Fructose, Glucose) (Redlin und Carris, 1997), erhöht die Wurzelbildungsrate und Leitfähigkeit des Wurzelsystems und vermindert die Reduktion der Sprossanzahl (West et al., 1993). Dies bestätigen auch Untersuchungen in Tschechien und Deutschland (Sachsen-Anhalt), die einen höheren Anteil endophytenbesiedelter Pflanzen bei trockenen gegenüber feuchten Standorten feststellten (Hesse et al., 1999; Cagaš, 2000).

Einige Studien beschäftigten sich mit der Beeinflussung von Pflanzenwachstum und -produktivität durch Endophyten. Clay (1987) und Latch et al. (1985) stellten sowohl eine erhöhte Keimfähigkeit als auch eine verbesserte Biomasseproduktion von endophytenbesiedelten *L. perenne*- und *F. arundinacea*-Gräsern fest. Nach Eggstein (1997) erhöht die Endophytenpräsenz zudem den Samenertrag der Pflanzen. Endophyteneffekte weisen grundsätzlich eine Abhängigkeit von Wirtspflanzen- und Pilzgenotyp (Cheplick, 1998) sowie von Umweltbedingungen (Clay, 1998) auf. Sie zeigen deutliche Ergebnisvariationen hinsichtlich Standort und Versuchsjahr (Hesse et al., 2000).

2.2.3.2.3 Alkaloide der Gras-Endophyt-Assoziation

Ein Hinweis auf die mutualistische Lebensweise der *Neotyphodium*-Endophyten mit ihren Wirtspflanzen ist die Synthese verschiedener Alkaloide, die die Toxizität der Lebensgemeinschaft für „Fraßfeinde“ zur Folge hat. Neben den Ergotalkaloiden sind bisher zahlreiche weitere Alkaloide identifiziert worden, beispielsweise das Lolitrem, die Loline oder das Peramin.

Lolitrem B ist ein Neurotoxin, das in die Gruppe der Indolalkaloide eingeordnet wird. Das Alkaloid wird vom endophytischen Pilz *N. lolii* synthetisiert (Fletcher und Harvey, 1981). Gemeinsam mit seinem Präkursor, dem Paxillin, bedingt es die Symptome der Weidetierkrankung ‚ryegrass staggers‘ (Fletcher et al., 1993; Rowan, 1993). In Abbildung 8 ist die Struktur von Lolitrem B dargestellt.

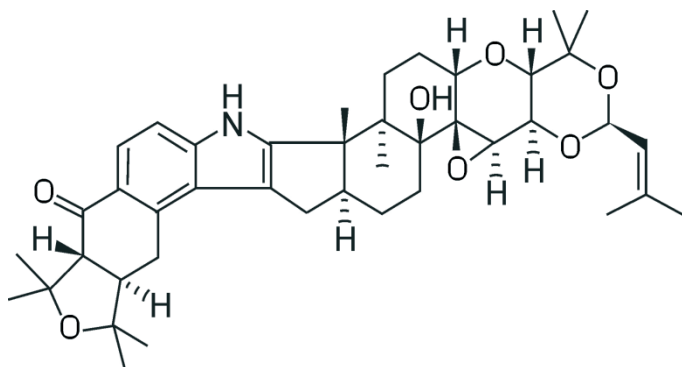


Abb. 8: Strukturformel von Lolitrem B

Die Höhe der nachgewiesenen Lolitrem-B-Gehalte in der Pflanze unterliegt jahreszeitlichen Variationen. Oldenburg (1997) untersuchte eine Sammlung von 100 Ökotyppopulationen von *L. perenne* in vier verschiedenen Regionen Deutschlands. Während die Konzentrationen von Lolitrem B im Frühjahr, Spätherbst und Winter gering waren (0,25–0,45 µg/g TM), fielen die Gehalte in den Sommermonaten und im frühen Herbst mit 0,5–1,4 µg/g TM deutlich höher aus. Reinholz (2000) ermittelte zum Teil hohe Lolitrem-B-Gehalte in Grasproben, was seiner Meinung nach auf die Möglichkeit des Auftretens der Weidelgras-Taumelkrankheit in Deutschland hinweist. Übersteigen die Lolitrem-B-Konzentrationen den toxischen Grenzwert von 2–2,5 µg/g der Trockenmasse, entwickeln sich bei den Tieren Anzeichen der Toxikose (DiMenna et al., 1992). Sie ist durch Inkoordination der Bewegungsabläufe, Taumeln, muskuläre Spasmen und Kollaps gekennzeichnet. Die neurologischen Störungen treten zeitlich begrenzt auf und der Gesundheitszustand der Tiere regeneriert sich üblicherweise nach kurzer Zeit. In extremen Fällen kann jedoch auch der Tod eintreten (Cheeke, 1995). Lolitrem-B-Konzentrationen unterhalb des toxischen Grenzwertes können aber durchaus subklinische Symptome wie geringere Milchproduktion, sinkende Protein- und Fettgehalte in der Milch und verminderte Lebendgewichtszunahmen hervorrufen (Miyazaki et al., 2001).

Ergopeptinalkaloide, insbesondere Ergovalin (Abb. 9), sind die zweite Alkaloidgruppe, die von *Neotyphodium*-Endophyten in Symbiose mit Rohrschwingel und Weidelgras synthetisiert werden. Diese Alkaloide gelten als auslösender Wirkstoff der *Festuca*-Toxikose (Bacon et al., 1986; Yates et al., 1985; Lyons et al., 1986), die auch als ‚summer slump syndrome‘ bezeichnet wird. Neben Symptomen wie bei der klassischen Mutterkornvergiftung, können auch verringerte Gewichtszunahmen, Fettgewebsnekrosen sowie gehäufte Probleme während der Brunst und der Reproduktionsrate bei Pferden auftreten (Thompson und Stuedemann, 1993; Cross et al., 1995).

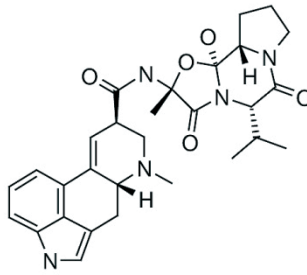


Abb. 9: Strukturformel von Ergovalin

Eine weitere bedeutende Gruppe der Alkaloide repräsentieren die Loline. Es handelt sich um Pyrrolizidinalkaloide, die unter anderem in Vergesellschaftung von *Festuca*- und *Lolium*-Gräsern mit endophytischen Pilzen vorkommen. Ein Nachweis in nichtinfizierten Gräsern oder im isolierten Pilz selbst gelang bisher nicht (Bush et al., 1982; Siegel et al., 1990). Vertreter der Gruppe, zu denen z. B. das N-Acetylloin und das N-Formylloin zählen, wurden in infizierten *F. arundinacea*-Gräsern in Konzentrationen von bis zu 7 mg/g TM entdeckt (Bush und Schmidt, 1994). Besonders hohe Konzentrationen wurden in den Fruchtständen und in den Spelzfrüchten nachgewiesen (Bush und Schmidt, 1994).

Peramin, ein Pyrrolopyrazin, wird den Azaindolidinalkaloiden zugeordnet (Rowan et al., 1990). Es ist aus der Symbiose von *L. perenne* und *F. arundinacea* mit *N. lolii* und *N. coenophialum* bekannt, tritt aber auch in der Verbindung von *N. uncinatum* mit *F. pratensis* auf. Gemeinsam mit den Lolininen hat das Peramin eine besonders positive Wirkung gegenüber schädlichen Insekten. Die Insektenresistenz beruht auf der endophyteninduzierten Peraminsynthese. Vor allem der in Neuseeland weit verbreitete Argentinische Stengelrüssler (*Listronotus bonariensis*) wird in seinen larvalen und adulten Entwicklungsstadien gehemmt (Rowan et al., 1990). Da Peramin für Weidetiere nicht toxisch ist und von verschiedenen *Neotyphodium*-Arten synthetisiert wird (Siegel et al., 1990), besitzt es großes Potential als natürliches Insektizid.

2.3 Nachweisverfahren für Ergotalkaloide in Futtergräsern

Analytische Testverfahren für Ergotalkaloide sind vor allem physikalisch-chemischer oder immunchemischer Natur, es werden aber auch Kombinationen verschiedener Testverfahren angewendet. Die folgenden Ausführungen beschreiben Möglichkeiten des Nachweises von

Ergotalkaloiden in Gräsern.

2.3.1 Histologische Nachweisverfahren für Endophyten

Histologische Verfahrenstechniken dienen vornehmlich der Untersuchung von Pflanzen- und Samenmaterialien auf Endophyteninfektion. Der Nachweis von Endophyten erfolgt durch mikroskopische Untersuchungen, bei denen die dem Pilz eigentümlichen Pilzhypen nachgewiesen werden. Als Ausgangsmaterial dienen die Blattscheiden und Halme frischer oder getrockneter *L. perenne*- oder *Festuca*-Pflanzen. Miyazaki et al. (2001) beschrieben eine Bengalrosa-Färbung des organischen Materials mit anschließender Lichtmikroskopie unter 400-facher Vergrößerung. Saha et al. (1988) färbten auch das Pilzmyzel der Karyopsen mit einer Bengalrosa-Färbung an. Das Probenmaterial wurde zunächst über 16 h in einer alkalischen Lösung (0,2 % Bengalrosa in 2,5 %iger NaOH) quellen gelassen und anschließend unter fließendem Wasser gespült. Nach Überführung in eine alkoholische Lösung (0,5 % Bengalrosa in 5 %igem Ethanol) für 3–4 Stunden erfolgte erneut eine Spülung unter fließendem Wasser. Der Nachweis des interzellulären Mycels der Aleuronschicht oder Samenschale erfolgte binokulär unter 250- bis 400-facher Vergrößerung. Oldenburg (1997) versetzte das Untersuchungsmaterial mit 50 ml 90 %iger Milchsäure und 100 ml von 0,1 %igem wässrigem Anilinblau. Die Anilinblau-Färbung wurde für die unspezifische Anfärbung der Pilzhypen in den Blattscheiden angewendet. Anschließend wurden die interzellularen Pilzhypen lichtmikroskopisch bei 320-facher Vergrößerung sichtbar gemacht. Zur direkten lichtmikroskopischen Untersuchung versetzten auch Miles et al. (1997) Samen potenziell endophyteninfizierter Gräser mit Lactophenol-Anilinblau. Um die Endophyten zu isolieren, erfolgte eine fünfminütige Oberflächensterilisation der Samen mit anschließender Spülung unter sterilem Wasser und Inkubation der Probe bis zum Stadium der Keimung. Nach Beimpfung des Keimlings mit Brühe und weiterer Inkubationszeit wurden Subkulturen auf Gibco-Kartoffel-Dextrose Agar und weiter auf Difco-Maismehlagar, Malzagar und modifiziertem Sabouraud-Agar überführt.

2.3.2 Physikalisch-chemische Nachweisverfahren für Alkaloide

2.3.2.1 Chromatographische Nachweisverfahren

Die Chromatographie stellt ein Verfahren dar, bei dem es zur Trennung von Stoffgemischen durch Verteilung eines Stoffes zwischen einer beweglichen (mobilen) Phase und einer

zweiten, stationären Phase aufgrund von Adsorptions- oder Lösungsvorgängen kommt. Bei unterschiedlichem Verhalten der Einzelkomponenten des Stoffgemisches werden sie in der mobilen Phase mit unterschiedlicher Geschwindigkeit transportiert und dadurch getrennt. Je nach Anordnung der stationären Phase unterscheidet man die Dünnschichtchromatographie, die Gas- und die Flüssigkeitschromatographie.

2.3.2.1.1 Dünnschichtchromatographie

Bei der Dünnschichtchromatographie (DC, engl. Thin Layer Chromatography, TLC) erfolgt die Trennung des Substanzgemisches an dünnen Schichten von Kieselsäuregel oder Aluminiumoxid, das als stationäre Phase dient. Die Auftrennung kann beispielsweise aufgrund der unterschiedlich hohen Polarität der einzelnen Komponenten erfolgen. Zur Separation der Ergotalkaloide hat sich besonders die Verwendung von Kieselsäuregelschichten bewährt (Prošek et al., 1977). Nach der Auftrennung der Ergotalkaloide erfolgt deren Detektion entweder direkt ohne vorausgehende Elution oder indirekt über die Elution der aktiven Substanz. Daran schließt sich eine Messung der UV-Absorption an oder die photometrische Bestimmung der Farbreaktion, die auf der Van-Urk's-Reaktion beruht (Prošek et al., 1976). Nach Perellino et al. (1993) können mit der DC an Kieselsäuregel die meisten aller bekannten Ergotalkaloide separiert werden. Dies bestätigt auch Scott (2007), der ebenfalls mittels TLC die wesentlichen natürlich vorkommenden Ergotalkaloide in Extrakten von Gras, Getreide und Futtermitteln bestimmen konnte.

Der Vorteil des Untersuchungsverfahrens liegt darin, dass mehrere Proben gleichzeitig unter kostengünstigen Bedingungen analysiert werden können. Nachteilig ist die generelle Ungenauigkeit der Dünnschichtchromatographie.

2.3.2.1.2 Gaschromatographie

Unter der Gaschromatographie (GC, engl. Gas chromatography) versteht man eine Analysemethode, bei der chemische Verbindungen aufgetrennt werden, die entweder als gasförmiges Gemisch vorliegen oder in eine verdampfbare Verbindung überführt werden können. Mithilfe von Detektoren lassen sich die aufgetrennten Komponenten qualitativ und quantitativ bestimmen, wobei vor allem die Massenspektrometrie von Bedeutung ist. Die Gaschromatographie eignet sich für die Bestimmung von Ergopeptinalkaloiden aufgrund ihrer

Instabilität nur unzureichend (Scott, 1993). Thermisch induzierte Peptidfragmente können aber in der methodischen Kombination von Kapillargaschromatographie und Massenspektrometrie separiert werden. Bei dieser Variante wird jedoch nur das Peptidstück des Moleküls identifiziert, Epimere wie z. B. Ergotamin oder Ergotaminin bleiben unberücksichtigt (Scott, 2007).

2.3.2.1.3 Flüssigkeitschromatographie

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl. High Pressure Liquid Chromatography) hat sich bereits in den 1970er Jahren als wertvolle Methode zur Analyse von Ergotalkaloiden etabliert. Sie ermöglicht den Nachweis einzelner Toxine auch in niedrigen Konzentrationsbereichen. Studien belegen die Bedeutung der HPLC als bevorzugte Screeningmethode zur Analyse von Ergopeptinalkaloiden endophyteninfizierter Gräser (Yates und Powell, 1988; Hill et al., 1993; Moubarak et al., 1993; Zhang et al., 1994). Die ermittelten Wiederfindungsraten von Ergopeptinen in Gräserextrakten beliefen sich auf <100 % (Hill et al., 1993). Als Methode der Wahl gilt nach Flieger et al. (1997) die ‚Reverse-phase‘-HPLC.

2.3.3 Immunchemische Nachweisverfahren

2.3.3.1 Enzymatische Verfahren zum Nachweis von Ergotalkaloiden in Gräsern

Bei dem Nachweis von Mykotoxinen über immunologische Verfahren erfolgt der Substanznachweis über Antikörper, die gegen die nachzuweisende Substanz gerichtet sind. Bisher wurden erst wenige Immuntests für Ergotalkaloide beschrieben, vor allem enzymimmunologische Verfahren. Die häufig gebrauchte Abkürzung ELISA leitet sich von dem Begriff „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ ab, der ursprünglich durch Engvall und Pearlman (1971) geprägt wurde. Im heutigen Sprachgebrauch finden vielfach auch die Begriffe „Enzyme Immunoassay“ (EIA) oder Enzymimmuntest Verwendung, die synonym verwendet werden können. Enzymimmuntests sind relativ schnell durchführbar, spezifisch und kostengünstig (Märtlbauer et al., 1991). Sie erfordern nur einen geringen apparativen Aufwand. Die Verfahren eignen sich daher für Screeninguntersuchungen und zur Untersuchung größerer Probenzahlen.

Mykotoxine besitzen ein Molekulargewicht <1.000 und gelten damit als niedermolekulare Substanzen. Sie lassen sich folglich nur mit kompetitiven Testprinzipien nachweisen, bei

denen markiertes und unmarkiertes Antigen um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen konkurrieren.

Beim *direkten kompetitiven EIA* sind die Antikörper entweder direkt oder über Anti-Ig-Antikörper im Rahmen der Doppelantikörpertechnik als Festphase an das Trägermaterial (Mikrotiterplatte) gebunden. Freies und enzymmarkiertes Antigen konkurrieren um die freien Bindungsplätze der Antikörper, während nicht gebundene Antigene nach ausreichender Inkubationszeit ausgewaschen werden. Durch Zugabe der farblosen Substratlösung (Chromogen) erfolgt die Enzym-Substrat-Reaktion. Der Substratumsatz durch das enzymgebundene markierte Antigen und die freie Antigenmenge in der Probe verhalten sich umgekehrt proportional zueinander: Je mehr freies Antigen in der Probe vorhanden ist, umso weniger enzymmarkiertes Antigen kann sich an die Antikörper binden.

Der *indirekte kompetitive EIA* erfolgt, indem ein Antigen-Protein-Konjugat an ein Trägermaterial (Mikrotiterplatte) bindet und damit als Festphase dient. Nach Zugabe der Probe erfolgt die Inkubation mit den spezifischen Antikörpern. Die freien Antigene in der Probe und die der Festphase konkurrieren miteinander um die freien Bindungsstellen der Antikörper. Nicht gebundene Antikörper werden durch Waschung entfernt. Anschließend wird sekundärer, enzymmarkierter Antikörper zugefügt, der gegen die Immunglobuline der Tierart gerichtet ist, von dem die spezifischen Antikörper stammen.

Die Entwicklung und der Einsatz von EIAs zur Analytik von einzelnen Ergotalkaloiden in endophyteninfizierten Gräsern wurden in der Literatur beschrieben (Shelby und Kelley, 1991b; Shelby, 1996; Schnitzius et al., 2001). Shelby et al. (1998) untersuchten infiziertes *F. arundinacea*-Pflanzenmaterial anhand eines kompetitiven indirekten EIA auf Ergovalin. Die dabei ermittelte Nachweisgrenze (NWG) lag bei 16 ng/g. Für die Analyse von Ergotamin versetzten Shelby und Kelley (1991a) Getreideproben künstlich mit diesem Toxin. Das Probenmaterial wurde anschließend mit einem indirekten kompetitiven EIA untersucht. Für Ergotamin betrug die NWG 10 ng/g.

Dihydroergotalkaloide werden üblicherweise nicht in Mutterkorn und endophyteninfiziertem Gras vorgefunden. Sie stellen jedoch das bedeutendste toxische Alkaloid von mit *C. africana* kontaminierten Getreidesorten dar. Molloy et al. (2003) bestimmten Dihydroergosin in Getreide unter Anwendung eines kompetitiven EIA. Bei Wiederfindungsraten von 77–103 %

betrug die NWG 10 ng/g. Unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers wurden Kreuzreaktionen mit Ergotamin und Dihydroergotamin offensichtlich.

Die Analytik von Ergotalkaloiden wird von in den USA kommerziell vertriebenen Testkits zum Schnellauchweis von Endophyten in Gräsern ergänzt. Daten aus Europa liegen für diesen Test nicht vor.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

Zur Verwendung in der HPLC

Acetonitril, gradient grade	Merck KGaA, 1.00030
Acetonitril, reinst	Merck KGaA, 1.15500
Ammoniumsulfat, p. a.	Merck KGaA, 1.01217
di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei, p. a.	Merck KGaA, 1.06586
di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat, p. a.	Merck KGaA, 1.06575
Ethylenglycol, p. a.	Merck KGaA, 1.09621
Kaliumdihydrogenphosphat, p. a.	Merck KGaA, 1.4877
L(+)-Weinsäure, p. a.	Merck KGaA, 1.1.00804
Methanol, p. a.	Merck KGaA, 1.06009
Natriumchlorid, p. a.	Merck KGaA, 1.06404
Natriumhydroxid, p. a.	Merck KGaA, 1.06498
1,2-Propandiol	Merck KGaA, 8.22324
Ethanol absolut, reinst	Merck KGaA, 1.00986

Sofern nicht ausdrücklich vermerkt, sind analysereine Chemikalien zu verwenden. Unter einer Lösung ist eine wässrige Lösung zu verstehen. Wasser ist von entsprechender Reinheit oder muss in Glasgeräten destilliert oder entmineralisiert worden sein.

3.1.2 Puffer und Lösungen

- 0,05 mol/l Bicarbonatpuffer (pH 9,6)
- „Enzymsubstrat/Chromogenlösung“:
Substratlösung für Meerrettichperoxidase: 0,2 mol/l Citratpuffer (pH 3,95) mit Zusatz von 3,15 mmol/l H_2O_2
Chromogenlösung (Tetramethylbenzidinlösung: 1 mmol/l 3,3', 5,5'-
Tetramethylbenzidinlösung gelöst in neun Teilen Methanol und einem Teil Aceton)
Gebrauchsfertige Lösung: 20 Teile Citratpuffer mit H_2O_2 -Zusatz und ein Teil

Tetramethylbenzidinlösung

- Stopplösung für die Farbreaktion: 1 mol/l Schwefelsäure (H₂SO₄)
- 0,01 mol/l phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS pH 7,2: 0,01 mol/l Phosphatpuffer mit 0,12 mmol/l Natriumchlorid)
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 6,0 (NaCl 6,79 g, KH₂PO₄ 0,43 g, A. dest. ad 1 l)
- 1%ige bzw. 2%ige Casein-PBS-Lösung (1 g bzw. 2 g Natrium-Caseinat in 100 ml PBS)
- Waschlösung (0,15 mol/l Natriumchlorid-Lösung mit Zusatz von 0,025 % Tween 20)
- Stabilisatorlösung für Ergotalkaloide (nach Ware et al., 2000): 10 ml Ethylenglycol, 10 ml 1,2-Propandiol, 0,1 g Weinsäure, mit Ethanol/A. dest auf 100 ml auffüllen
- Ergotalkaloid-Stammlösung: die einzelnen Ergotalkaloide werden mit jeweils 1 ml Stabilisatorlösung aufgelöst
- Ergotalkaloid-Standardlösungen für ELISA: Durch Verdünnung mit Stabilisatorlösung wird eine Mischung von Ergometrin/Ergotamin/Ergocristin im Verhältnis 1:10:14 hergestellt. Durch Verdünnung mit Acetonitril/PBS pH 6,0 (5:95; v/v) werden Standardlösungen mit den folgenden Gesamt-Ergotalkaloid-Gehalten hergestellt: 250 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml, 2 ng/ml, 0,4 ng/ml und 0,08 ng/ml.
Als Negativkontrolle (Blank, BLK) wird Acetonitril/PBS pH 6,0 (5/95; v/v) verwendet.
- Mischung von Standard-Ergotalkaloiden für die HPLC: Durch Verdünnung der Ergotalkaloide mit Stabilisatorlösung wird eine Mischung bekannter Konzentration hergestellt und daraus für jeden Untersuchungsgang eine neue Verdünnung angesetzt.
- Extraktionslösung: 60 Volumenteile Acetonitril mit 40 Volumenteilen PBS pH 6,0 mischen

3.1.3 Mykotoxine

Ergometrin

Sigma Aldrich GmbH, E-7008

Ergosin

Bundesamt für Gesundheit (BAG),
Bern, Schweiz

Ergotamin D-tartrat

Fluka GmbH, Nr. 45510

Ergocornin, > 95 %

Sigma Aldrich GmbH, E-131

α -Ergocryptin

Sigma Aldrich GmbH, E-5625

β -Ergocryptin	Bundesamt für Gesundheit (BAG), Bern, Schweiz
Egocristin	Sigma Aldrich GmbH, E-40
Ergometrinin	hergestellt aus Ergometrin
Ergosinin	hergestellt aus Ergosin
Ergotaminin	hergestellt aus Ergotamin
Ergocorninin	hergestellt aus Ergocornin
α -Ergocryptinin	hergestellt aus α -Ergocryptin
β -Ergocryptinin	hergestellt aus β -Ergocryptin
Egocristinin	hergestellt aus Egocristin

Die Herstellung der Epimere (*-inin*-Formen) der für die Untersuchungen notwendigen Ergotalkaloide erfolgte anhand der entsprechenden *-in*-Formen. Je 1 mg Alkaloid wurde mit 1 ml Methanol aufgelöst und mit 40 μ l Ammoniumhydroxid (25%ige wässrige Lösung) versetzt. Nach Mischung im Ultraschallbad (30 sec) erfolgte die Lagerung bei 37 °C über 7 d. Der Gehalt der *-in*- Form bzw. der *-inin*-Form der einzelnen Ergotalkaloide wurde mittels HPLC überprüft. Die Epimere wurden für diese Arbeit freundlicherweise von der Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt.

3.1.4 Immunreagenzien

Ergometrin-EIA: (Kompetitives direktes Testsystem, homologer Testaufbau)

Antikörper: Ergometrin AS, Kaninchen 29 Pool, gefällt

Konjugat: Ergometrin-HS-HRP-Lösung

Ergotamin-EIA: (Kompetitives direktes Testsystem, homologer Testaufbau)

Antikörper: Ergotamin AS, Kaninchen 32, Woche 14, gefällt

Konjugat: Ergotamin-PJ-HRP-Lösung

α -Ergocryptin-EIA: (Kompetitives indirektes Testsystem, heterologer Testaufbau)

Festphasen-Antigen: Ergotamin-BSA-I; Antikörper: Anti- α -Ergocryptin AS K34/12

Konjugat: Anti-Kaninchen-Ig-HRP (Dako Cytomation, Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunglobulins/HRP, P0217)

Ergocornin-EIA: (Kompetitives indirektes Testsystem, heterologer Testaufbau)

Festphasen-Antigen: Ergocryptin-BSA-I; Antikörper: Anti-Ergocornin AS 39/12)

Konjugat: Anti-Kaninchen-Ig-HRP (Dako Cytomation, Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunglobulins/HRP, P0217)

Die Immunreagenzien waren an der Professur für Milchwissenschaften entwickelt worden und standen für die eigenen Untersuchungen zur Verfügung. Die Spezifität der Testsysteme, wie im Abschlußbericht zu Projekt 03HS019 beschrieben, ist in Tabelle 5 zusammengestellt. Bezüglich der Testspezifität zeigte das Testsystem unter Verwendung von Antikörpern gegen Ergometrin eine besonders empfindliche Reaktion mit dem homologen Ergometrin, es wurden aber auch alle anderen Ergotalkaloide in niedrigen Konzentrationsbereichen miterfasst. Dabei dominierte das Erkennen der *-in-* gegenüber der *-inin-*Ergotalkaloide. Im Testsystem für Ergotamin zeigte sich eine deutliche Kreuzreaktivität mit Ergotaminin (68,8%), für Ergocristin wurde eine Kreuzreaktivität von 10,9 % ermittelt. Der Enzymimmuntest zum Nachweis von α -Ergocryptin verdeutlichte Struktur-Kreuzreaktivitäts-Beziehungen bereits innerhalb der Ergocryptine beider isomeren Formen. Das Testsystem für Ergocornin zeigte die höchste Sensitivität für β -Ergocryptinin. Alle *-inin*-Formen wurden besser erkannt als deren isomere Ursprungsformen.

Tab. 5: Relative Kreuzreaktionen für 14 Ergotalkaloide in den EIAs für Ergometrin, Ergotamin, α -Ergocryptin und Ergocornin. Vergleichend sind die im „Generic Ergot Alkaloid“-EIA erhaltenen 50%-Inhibitionskonzentrationen dieser Alkaloide angegeben. Es wurden die für jedes Toxin spezifischen Standardkurven im jeweiligen EIA erstellt und die zur 50%-Inhibition (halbmaximale Bindung) führende Konzentration ermittelt. Entnommen aus: Forschungsprojekt 03HS019 „Immunochemische Nachweisverfahren für Mutterkornalkaloide“, Usleber et al., 2007

Alkaloid	Molekular- gewicht	„Generic Ergot Alkaloid“-EIA	Ergometrin-EIA		Ergotamin EIA		α -Ergocryptin-EIA		Ergocornin-EIA	
		50 %- Inhibition (ng/ml)	50 %- Inhibition (ng/ml)	KR (%)	50 %- Inhibition (ng/ml)	KR (%)	50 %- Inhibition (ng/ml)	KR (%)	50 %- Inhibition (ng/ml)	KR (%)
Ergometrin	325,4	0,19	0,16	100	3790	0,008	10000	0,01	>1000	<1
Ergosin	533,7	35,9	26,7	1	554	0,09	21,6	8,58	>1000	<1
Ergocornin	561,7	17,3	12,9	2,1	1109	0,048	68,3	2,86	8,7	100
α -Ergocryptin	575,7	51,2	47,9	0,7	344	0,16	2	100	253	3,35
β -Ergocryptin	575,7	21,8	9,6	2,9	1230	0,044	18,4	10,9	41,1	21,7
Ergotamin	581,5	5,6	4,1	7	0,55	100	560,3	0,4	>1000	<1
Ergocristin	609,7	16,3	11,1	2,7	5,3	10,9	103,6	2	>1000	<1
Ergometrinin	325,4	42,9	12,5	1,28	1273	0,024	1885	0,06	1417	0,36
Ergosinin	533,7	130,3	156	0,17	50	1,01	17,6	10,5	248	3,33
Ergocorninin	561,7	204	202	0,14	2044	0,03	88	2,22	5	174
α -Ergocryptinin	575,7	1047,6	1445	0,01	2162	0,03	20	10	125	6,79
β -Ergocryptinin	575,7	916,1	921	0,03	553	0,1	18,2	11	3,7	241
Ergotaminin	581,5	38,3	29,3	1	0,8	68,8	239,6	0,8	417	2,2
Ergocristinin	609,7	214,8	177	0,05	9,9	5,3	135	1,4	1340	0,6

3.1.5 Geräte und Hilfsmittel

Gartenschere Classic 600

Heizrührer MR 3001

Mehrstellenrührgerät

Mikrotiterplattentaumelgerät Polymax 1040

Moulinette

Erlenmeyerkolben in verschiedenen Größen

Papierfaltenfilter

pH-Meter inoLab Level 1 mit Sen Tix HW Elektrode

Sartorius Waage Basic plus

Sartorius Waage Master Pro LA

Gardena

Heidolph GmbH

IKA Werke GmbH & Co
KG

Heidolph GmbH

Krupps GmbH, Art. GVA2

Schleicher & Schuell,
5155506

WTW GmbH

Sartorius AG

Sartorius AG

Variable Pipetten 0,5–10 µl, 10–100 µl, 100–1.000 µl	Eppendorf Gerätebau GmbH
Variable 12-Kanal-Pipette, 10–100 µl, 30–300 µl	Eppendorf Gerätebau GmbH
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc.

3.1.5.1 Enzymimmuntests

ELISA-Auto-Reader Tecan Sunrise	Tecan GmbH, Crailsheim
Mikrotiterplatten	ImmunoPlate MaxiSorp
	Nunc GmbH, 439454
Spektrophotometer UV 1601	Shimadzu Deutschland GmbH
Software: RIDAWIN Version 1.38	R-Biopharm AG, Darmstadt

3.1.5.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Bestandteile der HPLC-Anlage (Dionex):	
Trennsäule: Discovery HS C18 (25 cm x 4 mm, 5 µm)	Supelco, 568513-U
Pumpenserie P 580	Dionex GmbH
Probengeber Modell ASI 100 mit 200 µl-Probenschleife	Dionex GmbH
Photodiode PDA 100 Array Detector	Dionex GmbH
Fluoreszenzdetektor RF 200	Dionex GmbH
Säulenthermostat STH 583	Dionex GmbH
Fraktionskollektor 202	Gilson SAS
Fraktionscontroller 201–202	Gilson SAS
Verschraubbares HPLC-Probenfläschchen mit inertem Kunststoffdeckel	Merck KGaA, 5483051
Mikroeinsätze 300 µl für Probenfläschchen	Merck KGaA, SCER 15071
Reaktionsgefäße, Safe lock	Merck KGaA, 2112130
Datenauswertungssystem	Chromeleon

3.2 Methodik

Grundlage der angewendeten analytischen Verfahren war die Entwicklung von gruppen- bzw. substanzspezifischen Antikörpern gegen Ergotalkaloide zum Nachweis dieser Toxine in Getreide und Getreideprodukten. Diese waren im Rahmen eines vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) geförderten Projektes entwickelt worden.

3.2.1 Zeitlicher Versuchsablauf

Die Probenerfassung erstreckte sich über einen Zeitraum von zehn Monaten. Währenddessen wurde Schnittmaterial von Futtergräsern aus zwei verschiedenen Jahreszeiten gewonnen. Bei Proben der Vegetationsperiode I (VP I) handelte es sich um Gräser des Jahres 2007 (15. Juli–18. Oktober), während Proben der Vegetationsperiode II (VP II) im Jahr 2008 (30. März–11. April) gesammelt wurden. Einige Proben des Frühjahres 2008 konnten aufgrund der frühen jahreszeitlichen Gewinnung sowie der damit einhergehenden zarten Blattentwicklung und dem Fehlen von Blüten nicht eindeutig der Gattung *F. arundinacea* bzw. *L. perenne* zugeordnet werden. Dies wird im Folgenden jeweils spezifisch gekennzeichnet.

3.2.2 Probennahme

Das Pflanzenmaterial wurde von Weiden und Wiesen der dargestellten Regionen in Deutschland sowie deren Zuwegen gewonnen (Abb. 10). Zwischen den Sammelstellen wurde ein Mindestabstand von vier Kilometern eingehalten.

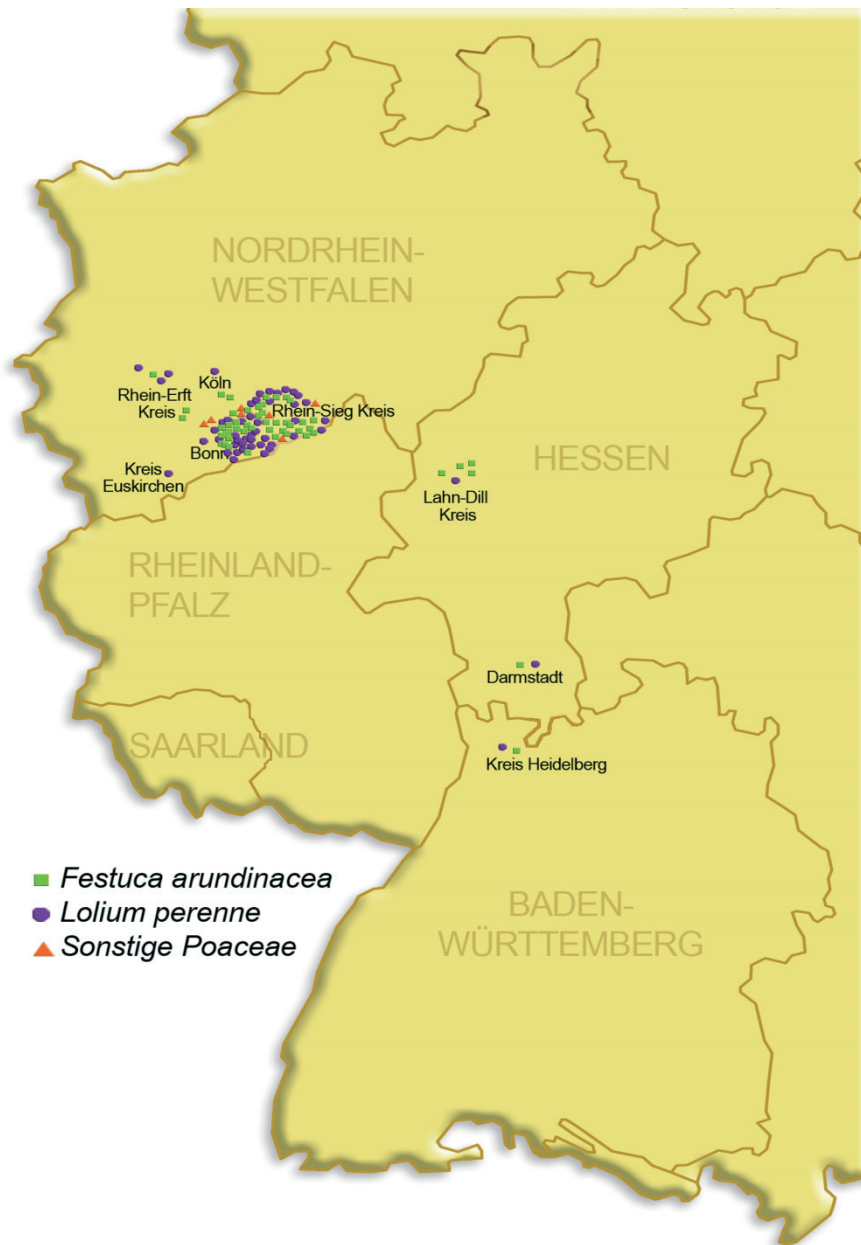


Abb. 10: Regionale Darstellung der beprobten Standorte

Zur Untersuchung von Ergotalkaloiden in Futtergräsern wurden insgesamt 104 Proben (Süßgräser verschiedener Gattungen) gesammelt (Tab. 6). Beprobte wurden nur Blüten bzw. nur Blätter oder Blätter, Blüte und Halm in ihrer Gesamtheit. Es wurden nur Pflanzen ausgewählt, deren Wuchsform einen Schnitt von 3–4 cm über dem Erdboden ermöglichte. Bis zur Untersuchung wurden die Proben bei Raumtemperatur (RT) in kompostierbaren, luftdurchlässigen Behältnissen gelagert.

Tab. 6: Spezies, Probenbestandteile und Anzahl der Proben in Vegetationsperiode I (Sommer 2007) und II (Frühjahr 2008)

Spezies	Probenbestandteile/n		
	Vegetationsperiode I		
	Blätter	Blüten	Blätter, Blüte, Halm
<i>Festuca arundinacea</i>	6	2	30
<i>Lolium perenne</i>	3	2	30
<i>Alopecurus pratensis</i>	1	1	
<i>Dactylis glomerata</i>	1	2	
<i>Plantago major</i>	1	1	
	Vegetationsperiode II		
<i>Festuca arundinacea</i>	12	-	-
<i>Lolium perenne</i>	12	-	-

3.2.3 Probenvorbereitung

Jede Grasprobe wurde mit einer Schere in nahezu gleich große, ca. 2–4 cm lange Teile geschnitten. Nach der Ermittlung des Feuchtgewichts wurde die Probe auf an den Rändern aufgefaltete Aluminiumfolie verteilt und im Trockenofen getrocknet. Der Trockenvorgang fand bei einer Temperatur von 40 °C statt. Die Dauer der Trocknung variierte in Abhängigkeit vom Alter und Standort der Pflanze sowie den jeweiligen Witterungsverhältnissen zum Zeitpunkt der Probennahme. Sie belief sich auf eine Dauer von ca. 16 h. Anschließend wurde das Probenmaterial zur Ermittlung des Trocknungsfaktors rückgewogen. Der Trocknungsfaktor setzte sich aus dem Gewicht der Probe nach der Trocknung/Gewicht vor der Trocknung zusammen. In einer Moulinette wurde die Probe so lange zerkleinert und vermischt, bis ein feines Pulver gewonnen werden konnte (Partikelgröße < 2 mm).

3.2.4 Probenextraktion

Im Rahmen des an der Professur für Milchwissenschaften durchgeführten Forschungsvorhabens wurde bereits ein Extraktionsverfahren für Ergotalkaloide in Getreide und Getreideerzeugnissen entwickelt. Dabei wurden 5 g Probe mit 25 ml Acetonitril/PBS pH

6,0 (60/40; v/v) versetzt und 30 min auf einem Magnetrührer extrahiert. Das Extraktionsgemisch wurde bis zum Absetzen der Feststoffe stehen gelassen. Anschließend wurden 2 ml des flüssigen Überstandes in ein Eppendorfgefäß überführt und zentrifugiert (11.000 x g, 20 °C, 4 min).

Für die eigenen Untersuchungen wurde dieses Extraktionsverfahren geringgradig modifiziert: Zur Extraktion wurde eine Probenmenge von 2 g verwendet. Die Extraktion auf dem Magnetrührer wurde auf 1h verlängert. Durch bloßes „Stehenlassen“ des Extraktionsgemisches erfolgte kein ausreichendes Absetzen der Feststoffe, da sich im flüssigen Überstand ein großer Anteil fester Probenpartikel befand. Als geeignete Alternative erwies sich daher die Durchführung einer Filtration. Eine weitere Modifikation ergab sich bei der Untersuchung von reinem Blütenmaterial. Da die Blüten sehr voluminös waren, wurden 2 g der Probe mit 40 ml Acetonitril/PBS pH 6,0 versetzt.

Zusammenfassend erwies sich für Gräser das folgende Probenextraktionsverfahren als effizient: Zur Extraktion wurden 2 g der gemahlenen Probe in ein Becherglas eingewogen und mit 20 ml Acetonitril/PBS pH 6,0 (60:40; v/v) versetzt. Anschließend wurde das Gemisch 1 h auf einem Magnetrührer extrahiert (500 upm). Der Extrakt wurde über einen Papierfaltenfilter filtriert und mit einer Eppendorf-Pipette ein Aliquot von 2 ml in ein Eppendorfgefäß überführt.

3.2.5 Anwendung der Nachweisverfahren

Die Untersuchungen von Futtergräsern auf das Vorkommen von Ergotalkaloiden erfolgten vorrangig mittels EIA. Zur Validierung wurde ein Methodenvergleich unter Verwendung eines hochdruckflüssigkeitschromatographischen Verfahrens mit Fluoreszenz-Detektion (HPLC) durchgeführt. Bei der Anwendung der EIA-Verfahren und der HPLC-Methodik wurde auf die im Forschungsprojekt „Immunchemische Nachweisverfahren für Mutterkornalkaloide“ bereits etablierte Methodik zurückgegriffen. Aufgrund des spezifischen Probenmaterials wurden die Testverfahren in einigen Aspekten optimiert.

3.2.5.1 Enzymimmuntests für den Nachweis von Ergotalkaloiden in Futtergräsern

Die Alkaloid-Standards Ergometrin, Ergocristin, Ergocornin, Ergotamin-Tartrat und α -

Ergocryptin waren zum Zeitpunkt der Untersuchung kommerziell erhältliche Materialien. Die in den EIAs verwendeten Standardlösungen wurden durch Verdünnung mit Acetonitril/PBS pH 6,0 (5:95; v/v) hergestellt, so dass die folgenden Gesamtergotalkaloid-Gehalte erzielt wurden: 250 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml, 2 ng/ml, 0,4 ng/ml, 0,08 ng/ml. Im Rahmen des Forschungsprojektes war zudem eine Mischung verschiedener Ergotalkaloide entwickelt worden, welche die Ergotalkaloide Ergometrin, Ergotamin und Ergocristin im Verhältnis 1:10:14 enthielt (Verdünnung in Stabilisatorlösung). Diese Ergotalkaloidmischung fand auch im Rahmen der eigenen Untersuchungen Anwendung. Zum Zweck einer Negativkontrolle (Blank, BLK) diente Acetonitril/PBS pH 6,0 (5:95; v/v). Die Standardlösungen wurden jeweils in vierfacher Replikation angewendet. Insgesamt wurden vier kompetitive EIAs auf ihre Eignung zur Untersuchung von Gräsern getestet. Dabei handelte es sich sowohl um direkte als auch um indirekte Enzymimmuntests.

3.2.5.1.1 Probenextraktverdünnungen

Zur weiteren Verwendung im Enzymimmuntest wurde ein Volumenteil des Extraktionsüberstandes mit neun Teilen PBS pH 6,0 verdünnt. Daraus resultierte die erste im Enzymimmuntest eingesetzte Extraktverdünnung. Aus der Kombination von Extraktion und Extraktverdünnung ergab sich ein Probenverdünnungsfaktor von 100. Je nach Grad der Kontamination waren bei einigen Probenmaterialien höhere Verdünnungsstufen nötig. Sie wurden ausgehend von der ersten im Enzymimmuntest eingesetzten Verdünnungsstufe mit Acetonitril/PBS pH 6,0 (5:95; v/v) angelegt. Die Durchführung der Probenextraktverdünnungen im EIA erfolgte routinemäßig im Vierfachansatz. Eine exemplarische Positionierung der Probenextrakte und Standardkonzentrate auf der Mikrotiterplatte ist in Abbildung 11 dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		S I 250 ng/ml	S II 50 ng/ml	S III 10 ng/ml	S IV 2 ng/ml	S V 0,4 ng/ml	S VI 0,08 ng/ml	BLK 0 ng/ml	P 1	P 2	P 3	
B		S I	S II	S III	S IV	S V	S VI	BLK	P 1	P 2	P 3	
C		S I	S II	S III	S IV	S V	S VI	BLK	P 1	P 2	P 3	
D		S I	S II	S III	S IV	S V	S VI	BLK	P 1	P 2	P 3	
E		P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10	P 11	P 12	P 13	
F		P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10	P 11	P 12	P 13	
G		P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10	P 11	P 12	P 13	
H		P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10	P 11	P 12	P 13	

Abb. 11: Beispielhaftes Belegungsschema einer 12 x 8-Mikrotiterplatte mit Standardlösungen (S I–S VI, BLK = Negativkontrolle) und verdünnten Probenextraktlösungen (P). Die Spalten 1 und 12 wurden in der Regel nicht belegt.

3.2.5.1.2 Durchführung des direkten kompetitiven EIA

Mikrotiterplatten wurden mit gefälltem Anti-Kaninchen-IgG (100 µl/Kavität in Bicarbonatpuffer pH 9,6) beschichtet und über Nacht bei RT in einer feuchtigkeitsgesättigten Kammer inkubiert. Nicht in zeitlicher Nähe verbrauchte Platten ließen sich bis zu vier Wochen bei 4 °C aufbewahren. Nach Abkippen der Flüssigkeit aus den Kavitäten wurden freie Proteinbindungsstellen mit 2%iger Casein/PBS-Lösung abgesättigt (200 µl/Kavität) und 30 min bei RT inkubiert. Daran fügte sich ein erneuter Waschschrift an. Jeweils im Vierfachansatz wurde anschließend Toxinstandardlösung bzw. Probenextraktionslösung zupipettiert (50 µl/Kavität) sowie in gleicher Menge eine Negativkontrolle (BLK) in 5 % Acetonitril/PBS zugefügt. Weiterhin wurde in jede Kavität 50 µl Toxin-HRP-Konjugat (1:2000 in 1 % Casein/PBS-Lösung) pipettiert und für weitere 2 h bei RT inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Platten erneut gewaschen. In jede der Kavitäten wurden schließlich jeweils 100 µl Enzymsubstrat-Chromogen-Lösung gefüllt. Nach 10–20 Minuten Inkubationszeit wurde die Farbreaktion unter Zugabe von 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) abgestoppt werden. Die Farbentwicklung der Negativkontrolle (BLK) war zu diesem Zeitpunkt als mittelblauer Farbton identifizierbar. Zur Messung der Extinktion wurde die Mikrotiterplatte in das Lesegerät eingelegt. Bei einer Wellenlänge von 450 nm erfolgte die

quantitative Auswertung des Testverfahrens. Die direkten kompetitiven EIAs dienten dem Nachweis von Ergotamin und dem gruppenspezifischen Nachweis für Ergotalkaloide in den Gräserproben.

3.2.5.1.3 Durchführung des indirekten kompetitiven EIA

Mikrotiterplatten wurden mit der entsprechenden Toxin-Bovines-Serum-Albumin-(BSA)-Lösung beschichtet (100 µl/Kavität in Bicarbonatpuffer pH 9,6) und über Nacht bei RT inkubiert. Dem Ausschlagen der Platten folgte die Absättigung der freien Proteinbindungsstellen mit 2%iger Casein/PBS-Lösung (200 µl/Kavität). Nach einem Waschschrift wurde im Vierfachansatz in jede Kavität 50 µl der jeweiligen Toxinstandardlösung bzw. der Probenextraktionslösung pipettiert. Je Kavität wurden anschließend 50 µl des entsprechenden Antiserums zugefügt. Es folgte eine Inkubationszeit von 1 h bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschschrift wurde Anti-Kaninchen-IgG-HRP-Lösung (in 1%iger Casein/ PBS-Lösung) in einer Menge von 100 µl/Kavität pipettiert und eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Danach wurden die Platten erneut gewaschen und in jede Kavität 100 µl Enzymsubstrat- Chromogen-Lösung gefüllt. Das Abstoppen der Farbreaktion erfolgte nach 10–20 min mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität). Das Reagenz bewirkte einen Farbumschlag in den Kavitäten von Blau nach Gelb. Die Absorptionsmessung und die Auswertung der Ergebnisse erfolgten entsprechend der Ausführungen unter 3.2.5.1.2.

Die indirekten kompetitiven EIAs dienten dem Nachweis von Ergocornin und α -Ergocryptin in den Gräserproben. Tabelle 6 zeigt eine Übersicht über die im Rahmen der kompetitiven enzymimmunchemischen Nachweisverfahren für Ergotalkaloide verwendeten Antiseren, Toxinstandardlösungen und Toxin- HRP-Konjugate.

Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Antiseren, Toxinstandards und Toxin-HRP-Konjugate zum Nachweis von Ergotalkaloiden in Gräsern

EIA	Ergotalkaloid-nachweis	Toxinstandard - lösung	Festphasen-Antigen	Antiserum	Enzym-Konjugat
Direkter kompetitiver ELISA (homologer Testaufbau)	Ergotalkaloide gesamt (gruppen-spezifischer Test, „Generic Ergot Alkaloid“)	Ergometrin 25 µg/ml	–	Anti-Ergometrin-AK (Kaninchen AS 29 Pool, gefällt), (1:2000 in Bicarbonat-puffer)	Ergometrin HS-HRP 1:2000 in 1 % Casein/PBS
	Ergotamin	Ergotamin 1 µg/ml	–	mit Kaninchen AS 32, gefällt, 1:2000 in Bicarbonat-puffer beschichtete Platten	Ergotamin-PJ-HRP, 1:1000 in 1 % Casein/PBS
Indirekter kompetitiver ELISA (heterologer Testaufbau)	α-Ergocryptin	α-Ergocryptin 50 µg/ml	Ergotamin-BSA I, 1:1000	Kaninchen AS 34, 1:5000	Anti-Kaninchen-IgG-HRP (DAKO P 0217), 1:1000 in 1 % Casein/PBS
	Ergocornin	Ergocornin 200 µg/ml	α-Ergocryptin-BSA I, 1:1000	VP I: Kaninchen AS 39, 1:2000	VP I: Anti-Kaninchen-IgG-HRP (DAKO P 0217), 1:500 in 1 % Casein/PBS
				VP II: Kaninchen AS 39, 1:3000	VP II: Anti-Kaninchen-IgG-HRP (DAKO P 0217), 1:1000 in 1 % Casein/PBS

3.2.5.1.4 Berechnungsgrundlagen

Der Ergotalkaloidgehalt in den Probenextrakten wurde über die Extinktionsmesswerte (Absorption) von der Auswertungssoftware (Ridawin Version 1.38) quantitativ bestimmt. Die Berechnung basierte auf der Dosis-Wirkungs-Standardkurve für Ergotalkaloid-Standardlösungen. Prinzipiell sollte die Standardkurve einen sigmoiden Verlauf aufweisen, in für die einzelnen EIAs spezifischen Konzentrationsbereichen besaß sie aber einen annähernd linearen Bereich. Durch Verrechnung der Messwerte für Standards und Probenextrakte (B) mit der Negativkontrolle (B_0) sollten diese normalisiert werden (% Absorption, $B/B_0 \cdot 100$). Diesbezüglich wurde die folgende Formel angewendet:

$$\frac{\text{Mittelwert Messwert Standardlösung/Probenextraktlösung (B)}}{\text{Mittelwert Messwert Negativkontrolle (B}_0\text{)}} \cdot 100$$

Um Angaben über die Ergotalkaloid-Konzentrationen im Probenmaterial zu erhalten, erfolgte eine weitere Berechnung. Dabei wurde die errechnete Konzentration für die gemessene Probenextraktlösung mit dem jeweiligen Probenfaktor multipliziert.

3.2.5.1.5 Bestimmung der Testsensitivität

Die Bestimmung der Sensitivität der EIAs zum Nachweis von Ergometrin, Ergotamin, α -Ergocryptin und Ergocornin erfolgte für die Standardkonzentrate anhand der Nachweisgrenze des jeweiligen Testsystems. Diese wurde aufgrund empirischer Daten bei einem relativen Absorptionswert von 80 % B/B_0 festgelegt. Die Testsensitivität der Untersuchungsverfahren für die Proben berechnete sich demnach anhand der Multiplikation von Nachweisgrenze und Verdünnungsfaktor.

3.2.5.1.6 Testspezifität

Zur Überprüfung der Spezifität des in den jeweiligen Testsystemen als Immunogen verwendeten Ergotalkaloids gegenüber anderen Ergotalkaloiden wurden bereits im Rahmen des an der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführten Forschungsprojekts Untersuchungen durchgeführt.

Für Ergotamin und Ergometrin wurden die entsprechenden Immunreagenzien (AS K32/14, Ergotamin-PJ-HRP bzw. AS K29/Pool 1, Ergometrin-HS-HRP) in direkten EIAs verwendet.

Die Prüfung der Testspezifität für α -Ergocryptin erfolgte im indirekten kompetitiven EIA (AS K34/12, Ergotamin-BSA-I). Bei der Spezifitätsprüfung des Tests für Ergocornin wurde auf das AS K39/12 und auf α -Ergocryptin-BSA-I im indirekten kompetitiven EIA zurückgegriffen. Der Prüfung dienten folgende zur Verfügung stehende Toxinstandards: Ergometrin, Ergotamin, α -Ergocryptin, β -Ergocryptin, Ergocristin, Ergocornin, Ergosin und deren korrespondierende *-inin-* Formen. Die Toxinstandards wurden in Maximalkonzentrationen von 10 $\mu\text{g/ml}$ in Acetonitril/PBS (5:95, v/v) im Testsystem eingesetzt. Die Standardkonzentrationen der Referenzsubstanz betrugen für den Ergometrin-EIA 15–0,005 ng/ml, für den Ergotamin-EIA 200–0,064 ng/ml, für den α -Ergocryptin-EIA 100–0,032 ng/ml sowie für den Ergocornin-EIA 1.000–1 ng/ml.

Nach Messung der 50-%-Dosen ermittelte sich die relative Kreuzreaktion wie folgt:

$$\text{relative Kreuzreaktion (\%)} = \frac{\text{50\%-Dosis Ergotalkaloid} * \text{Molekulargewicht}}{\text{50\%-Dosis Testtoxin} * \text{Molekulargewicht}} * 100$$

Die Daten sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

3.2.5.1.7 Bestimmung der Wiederfindung

Die Wiederfindung (Wiederfindungsrate) ist das Verhältnis des unter Wiederholungsbedingungen gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert des Analyten in einer Probe (Kromidas, 1999). Die Bestimmung der Wiederfindungsrate ermöglicht die Bewertung der Extraktionseffektivität der Methode. Liegt eine hohe Wiederfindungsrate vor, weist dies auf geringe Substanzverluste während der einzelnen Analyseschritte hin. In dieser Studie erfolgte die Bestimmung der Wiederfindungsrate, indem einzelne Proben mit jeweils bekannten Konzentrationen (1–1.000 ng/g) der Ergotalkaloidmischung (Ergometrin, Ergotamin und Ergocristin im Verhältnis 1:10:14), Ergotamin bzw. α -Ergocryptin und Ergocornin künstlich kontaminiert und aufbereitet wurden. Anschließend wurden die Proben in den entsprechenden EIA eingesetzt. Zur Berechnung der Wiederfindung wurde die Ausgangskonzentration von den Messergebnissen subtrahiert:

$$\text{Wiederfindungsrate (\%)} = \frac{\text{Testergebnis der dotierten Probe} - \text{Leerwert}}{\text{Dotierung}} * 100$$

Die Aufbereitung erfolgte bei den einzelnen Proben, indem dem Pflanzenmaterial 10–100 µl unterschiedlich konzentrierte Toxinstandardlösung (in Stabilisatorlösung: 100 ml Ethylenglycol + 100 ml 1,2-Propandiol + 1 g Weinsäure; aufgefüllt auf 1 Liter mit Ethanol-Wasser [25:75, v/v] (nach Ware et al., 2000) zugetropft wurde. Die anschließende Extraktion wurde entsprechend der Ausführungen unter 3.2.4 durchgeführt.

3.2.5.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographischer Nachweis von Ergotalkaloiden in Futtergräsern

Im Rahmen des Forschungsprojektes wurde an der Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen eine HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion entwickelt und optimiert. Das quantitative Verfahren diente ursprünglich der Bestimmung von 14 Ergotalkaloiden in Speisegetreide, Getreidemehl und Brot nach Reinigung des Probenextraktes über SCX-Säulen im Konzentrationsbereich von > 0,1–0,3 µg/kg. In der vorliegenden Arbeit wurden die HPLC-Analysen für die Evaluierung der Enzymimmuntests bei ausgewählten Gräserproben (n=11) eingesetzt. Es wurden ausschließlich Gräser der Gattungen *L. perenne* und *F. arundinacea* aus der ersten Vegetationsperiode untersucht.

Die quantitative Bestimmung der Einzelalkaloide verfolgte vor allem das Ziel, die Ergebnisse der Enzymimmuntests zu überprüfen.

3.2.5.2.1 Probenvorbereitung und Probenextraktion

Für die Probenaufbereitung wurden die Gräserproben wie unter Punkt 3.2.3 beschrieben getrocknet und gemahlen. Die Probenextraktion erfolgte entsprechend der Ausführungen unter 3.2.4. Bei den eigenen Untersuchungen wurde keine Aufreinigung des Probenextrakts über Strong-Cation-Exchange-(SCX)-Säulen durchgeführt.

3.2.5.2.2 Analysebedingungen

In Gräsern der Gattungen *L. perenne* und *F. arundinacea* erfolgte die Identifizierung der Toxine unter den im Folgenden angegebenen chromatographischen Bedingungen:

Stationäre Phase: Trennsäule HS C 18; 25 cm x 4 mm, 5 µm

Mobile Phase: A. Acetonitril, gradient grade
B. 0,01 % Ammoniumsulfat, p. a. in A. dest
C. Acetonitril/PBS pH 7,2 (50/50; v/v)

Flussrate der mobilen Phase: 1 ml/min

Gradientenprogramm:

Zeit (min)	Zusammensetzung der mobilen Phase (Gradient, %)		
	A. Acetonitril	B. A. dest	C. Acetonitril/PBS pH 7,2
		(mit 0,1 g Ammoniumsulfat)	(50:50, v/v)
0	25	55	20
4	37	63	0
8	45	55	0
10	50	50	0
20	40	60	0
37	55	45	0
47	55	45	0
50	80	20	0
55	80	20	0
57	25	55	20
65	25	55	20

Säulentemperatur: 30 °C

Injektionsvolumen: 50 µl

Gesamtlaufzeit für ein Chromatogramm: 65 min

Detektion: Fluoreszenz, Excitationswellenlänge 312 nm
Emissions-(Detektions-)Wellenlänge 418 nm

Für die Durchführung der HPLC-Methode wurden ausschließlich natürlich mit Ergotalkaloiden kontaminierte Proben verwendet.

3.2.5.2.3 Identifizierung

Unter der Retentionszeit (t_R) wird die Zeit verstanden, die die Stoffkomponente zum Durchlaufen des Trennsystems benötigt. Nach Vergleich der Retentionszeit des einzelnen Ergotalkaloids mit der Retentionszeit für Standardlösungen ergaben sich für Ergotalkaloide die in Tabelle 8 dargestellten Ergebnisse.

3.2.5.2.4 Kalibriergerade

Nach zweifacher Injektion jeder Standardlösung erfolgte die Erstellung der Kalibriergeraden durch lineare Korrelation, basierend auf der berechneten Peakfläche für Standardlösungen.

3.2.5.2.5 Quantifizierung

Zur Bestimmung der Ergotalkaloid-Gehalte wurde die Methode der externen Standardberechnung angewendet. Ausgehend von der erstellten Kalibriergeraden erfolgte die Ergotalkaloid-Quantifizierung nach Berechnung der Peakfläche für Probenpeaks entsprechend der Retentionszeit des Ergotalkaloid-Standards.

3.2.5.2.6 Berechnungsgrundlagen

Die absoluten Nachweisgrenzen und die Bestimmungsgrenzen für 14 ausgewählte Ergotalkaloide sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tab. 8: Retentionszeit, Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze der HPLC-Methode. Die Retentionszeiten der Ergotalkaloide entsprechen den unter 3.2.5.2.2 genannten Analysebedingungen

Alkaloid	Retentionszeit (min)	Nachweisgrenze absolut (pg/ml)	Nachweisgrenze in Probe (µg/kg)	Bestimmungsgrenze in Probe (µg/kg)
Ergometrin	3,3	2,5	0,06	0,19
Ergometrinin	5,5	4,2	0,10	0,30
Ergosin	12,5	2,2	0,05	0,16
Ergosinin	28,1	9,8	0,25	0,74
Ergotamin	13,5	2,1	0,05	0,16
Ergotaminin	33,5	7,2	0,18	0,54
Ergocornin	15,9	3,1	0,08	0,23
Ergocorninin	38,1	4,3	0,11	0,32
α-Ergocryptin	19,2	6,3	0,16	0,47
α-Ergocryptinin	43,2	4,7	0,12	0,35
β-Ergocryptin	20,9	6,9	0,17	0,52
β-Ergocryptinin	43,7	4,9	0,12	0,37
Ergocristin	21,8	10,2	0,26	0,77
Ergocristinin	46,3	6,03	0,15	0,45

Um den Ergotalkaloid-Gehalt im Probenmaterial zu berechnen, wurde nachstehender Rechenweg angewendet:

$$\text{Ergotalkaloid, ng/g im Probenmaterial} = A \times F$$

Dabei ist: **A:** die aus der Kalibriergeraden abgelesene Masse für das Ergotalkaloid, die der gemessenen Peakfläche entspricht; angegeben in Nanogramm je Injektionsvolumen

F: Probenverdünnungsfaktor des Extraktionsverfahrens.
Dem Injektionsvolumen von 50 µl einer Probenmenge entspricht 0,005 g Probenmaterial und **F** = 200.

3.2.5.2.7 Methodenvergleich

Ausgewählte Grasproben wurden mittels Enzymimmuntest und HPLC untersucht. Anhand der linearen Regression wurden mögliche Übereinstimmungen definiert.

3.3 Methodische Auswertungskriterien

Zur Auswertung der Untersuchungsergebnisse wurden die Gräser in speziesspezifische Gruppen kategorisiert. Die Auswertung der Gruppen erfolgte getrennt von einander. Alle Proben, die Toxinkonzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze erzielten, wurden als positiv gewertet und in die Auswertung einbezogen. Um die jahreszeitliche Belastungssituation zu berücksichtigen, wurden die Gräser in unterschiedlichen Vegetationsperioden gesammelt. Jede Vegetationsperiode wurde separat ausgewertet. Weiterhin wurde berücksichtigt, ob die Gräserextrakte als alleinigen Bestandteil die Blätter/Blüten oder Halm, Blatt und Blüte in ihrer Gesamtheit enthielten.

Die statistischen Berechnungen wurden mit den Programmen Statistical Program for the Social Sciences (SPSS, Version 15) und Predictive Analytics Software (PASW, Version 17) durchgeführt. Sie basieren auf beschreibenden Maßzahlen, wie dem Mittelwert und der Standardabweichung, Minimum und Maximum sowie den Quartilen. Als analytisches Verfahren wurde die Korrelationsanalyse nach Pearson angewendet.

4 ERGEBNISSE

Die Untersuchungsergebnisse beziehen sich ausschließlich auf getrocknete Gräser. Der Trocknungsfaktor betrug im Mittel 0,52. Folglich wären die Grasproben im frischen Zustand um einen Faktor von ca. 2 niedriger mit Ergotalkaloiden kontaminiert. Die Einzelergebnisse des für alle 104 Proben ermittelten Ergotalkaloidvorkommens einschließlich ihrer Herkunft, Zusammensetzung und Zeitpunkt der Gewinnung sind in Anhang 1–3 aufgeführt.

4.1 Untersuchungsverfahren

4.1.1 Auswertung der Enzymimmuntests

Die Ergebnisse der Auswertung der erstellten Standardkurven für die Enzymimmuntests („Generic Ergot Alkaloid“, Ergotamin, α -Ergocryptin und Ergocornin) sind in den Tabellen 9–12 zusammengefasst. Für die Auswertung wurden Standardkurven des gesamten Untersuchungszeitraums berücksichtigt. Charakteristische Standardkurven der vier angewendeten Enzymimmuntests sind in den Abbildungen 12–15 dargestellt.

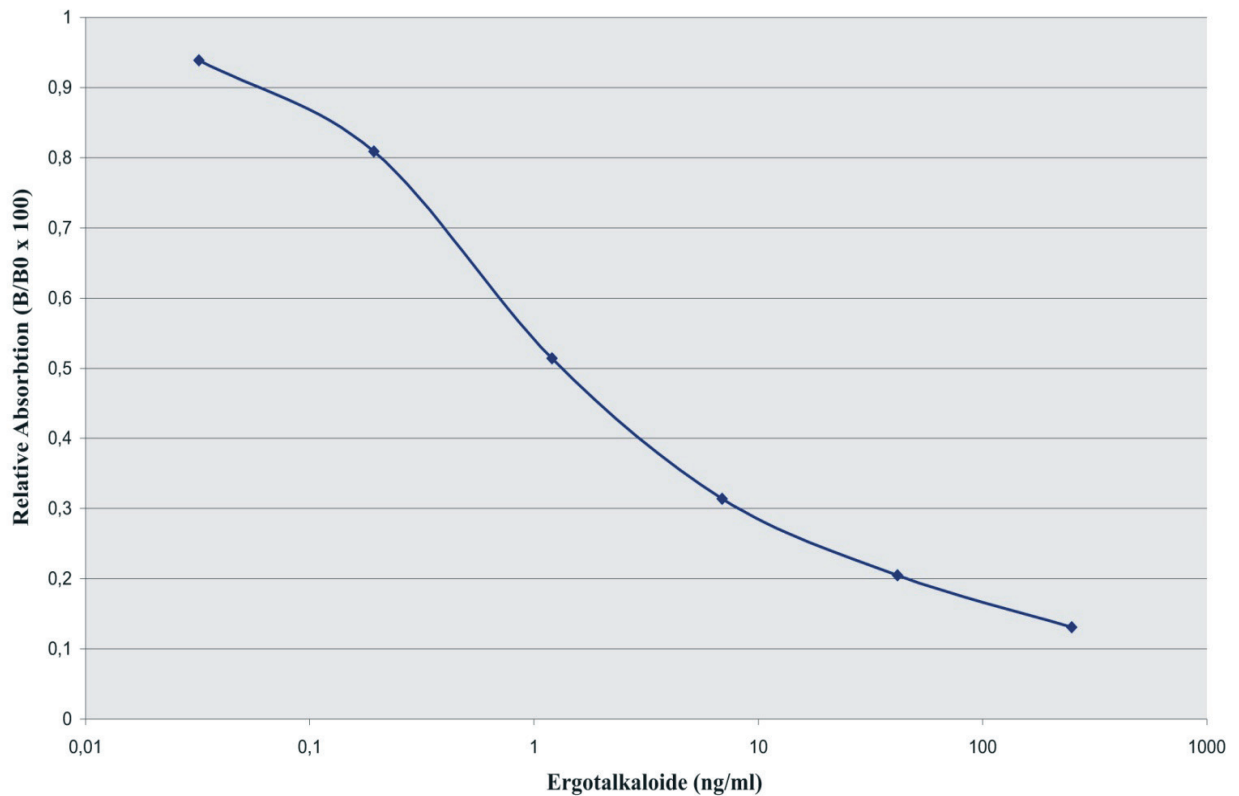


Abb. 12: Charakteristische Standardkurve des „Generic Ergot Alkaloid“-Enzymimmuntests zum Nachweis von Ergotalkaloiden. Die Zusammensetzung der Toxinstandard-Mischung war wie folgt: Ergometrin, Ergotamin und Ergocristin im Verhältnis 1:10:14.

Tab. 9: Standardkurvenparameter (50%-Inhibitionsdosis) des gruppenspezifischen Nachweises für Ergotalkaloide nach Auswertung von 30 Tests

Parameter	
Mittelwert	1,8 ng/ml
Standardabweichung	0,7 ng/ml
Variationskoeffizient	39 %
Minimalwert	1,2 ng/ml
Maximalwert	4,0 ng/ml

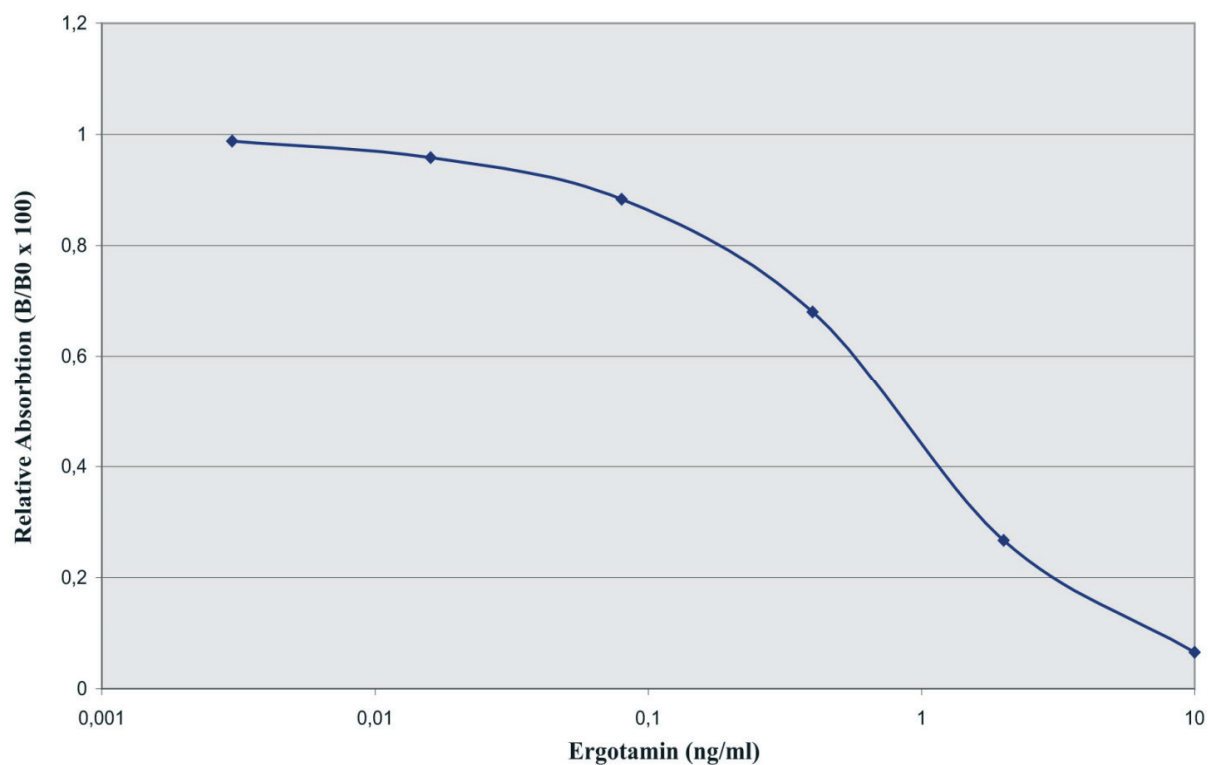


Abb. 13: Charakteristische Standardkurve des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Ergotamin

Tab. 10: Standardkurvenparameter (50%-Inhibitionsdosis) des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Ergotamin nach Auswertung von 45 Tests

Parameter		
Mittelwert		0,7 ng/ml
Standardabweichung		0,1 ng/ml
Variationskoeffizient		14,3 %
Minimalwert		0,6 ng/ml
Maximalwert		0,9 ng/ml

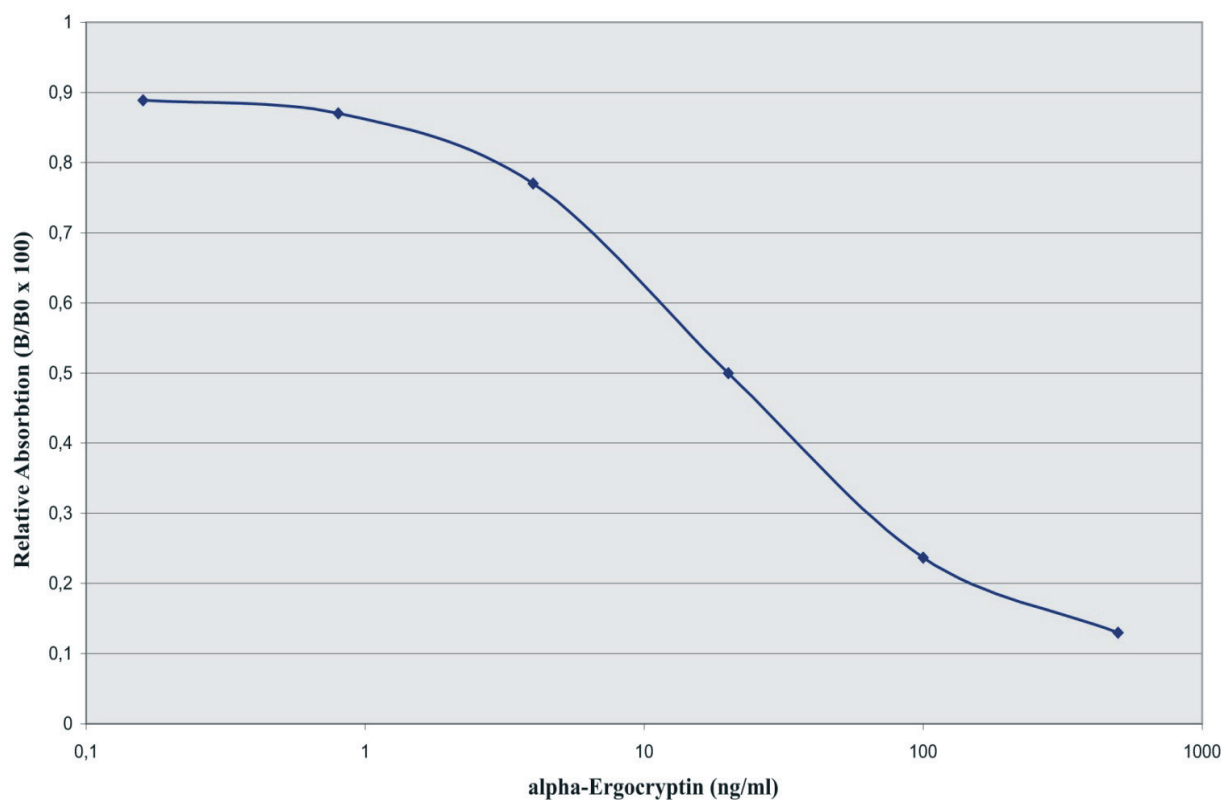


Abb. 14: Charakteristische Standardkurve des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von α -Ergocryptin

Tab. 11: Standardkurvenparameter (50%-Inhibitionsdosis) des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von α -Ergocryptin nach Auswertung von 30 Tests

Parameter	
Mittelwert	22,4 ng/ml
Standardabweichung	4,7 ng/ml
Variationskoeffizient	21,0 %
Minimalwert	14,4 ng/ml
Maximalwert	29,8 ng/ml

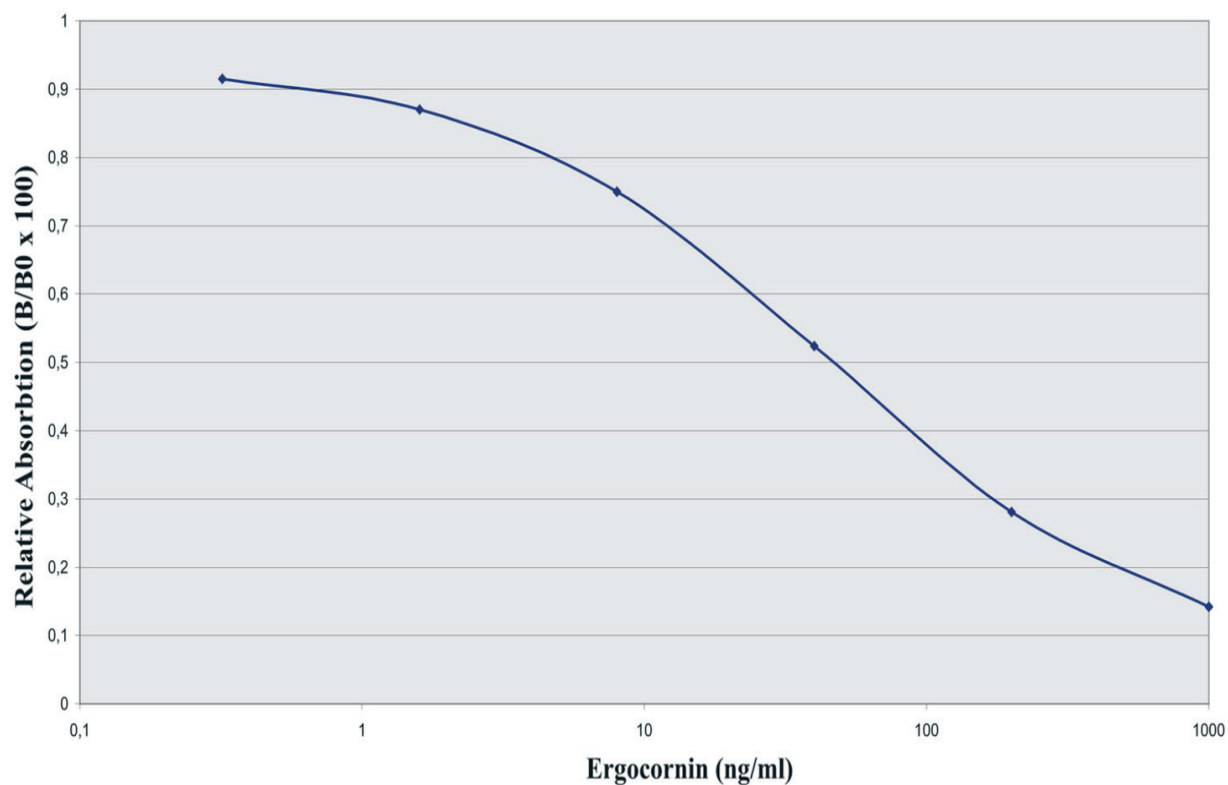


Abb. 15: Charakteristische Standardkurve des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Ergocornin

Tab. 12: Standardkurvenparameter (50%-Inhibitionsdosis) des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von Ergocornin nach Auswertung von 34 Tests

Parameter	
Mittelwert	70,4 ng/ml
Standardabweichung	41,0 ng/ml
Variationskoeffizient	58,2 %
Minimalwert	22,0 ng/ml
Maximalwert	149,5 ng/ml

4.1.2 Testsensitivität und Testspezifität

Die Nachweisgrenze für den „Generic Ergot Alkaloid“-EIA betrug 0,4 ng/ml. Für Ergotamin lag die Nachweisgrenze bei 0,2 ng/ml. Die Nachweisgrenze für α -Ergocryptin betrug 4,5 ng/ml. Für Ergocornin wurde eine Nachweisgrenze von 17 ng/ml ermittelt. Die Nachweisgrenze für Ergotalkaloide in den Gräsern lag unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors im „Generic Ergot Alkaloid“-EIA bei 40 μ g/kg. Für Ergotamin betrug die Nachweisgrenze 20 μ g/kg. Die Nachweisgrenze für α -Ergocryptin lag bei 450 μ g/kg. Für Ergocornin betrug die Nachweisgrenze 1.700 μ g/kg.

Die Spezifitätsprüfung für 14 Ergotalkaloide in den direkten und indirekten Testsystemen ergab die in Tabelle 5 (s.S. 39) dargestellten Kreuzreaktionen.

4.1.3 Wiederfindungsraten

Die Wiederfindungsraten von der Toxin-Standard-Mischung im Generic Ergot Alkaloid-EIA in künstlich kontaminierten *L. perenne*- und *F. arundinacea*-Gräsern sind in Tabelle 13 zusammengefasst..

Tab. 13: Wiederfindungsraten für Ergotalkaloide in künstlich kontaminierten Gräsern der Gattung *L. perenne* und *F. arundinacea* ermittelt im Generic Ergot Alkaloid-EIA.

Probe	Ergotalkaloid-Zusatz* (ng/g)	Anzahl	Mittlere Wiederfindung (%)
<i>L. perenne</i>	500	2	114,5
	1.000	2	99
<i>F. arundinacea</i>	500	4	114,8
	1.000	4	99

* Zusatz von Standard-Mischung aus Ergometrin, Ergotamin und Ergocristin im Verhältnis 1:10:14

Die Untersuchung von künstlich mit Ergotamin kontaminierten *L. perenne*-Proben (Toxinzusatz: 200 ng/g) ergab eine mittlere Wiederfindungsrate von 237 %. Nach Zusatz von 500 ng/g Ergotamin betrug die mittlere Wiederfindungsrate 146 %. *F. arundinacea*-Proben wurde 200 ng/g sowie 500 ng/g Ergotamin zugesetzt. Die nach Abzug der

Ausgangskontamination ermittelten Wiederfindungsraten lagen bei 187 % bzw. bei 106 %. Bei der Ermittlung der Wiederfindungsraten für Ergocornin wurden keine verwertbaren Ergebnisse erzielt. *L. perenne* und *F. arundinacea*-Proben (n=4) wurden 1–20 ng/g Ergocornin zugesetzt. Die Wiederfindungsraten betrugen 240–635 % (*L. perenne*) bzw. 240–680 % (*F. arundinacea*). Auch die Untersuchungen von künstlich mit α -Ergocryptin kontaminierten Gräserproben ergaben Wiederfindungsraten in nicht verwertbaren Ergebnisbereichen.

4.2 Ergebnisse der Enzymimmuntests für den Nachweis von Ergotalkaloiden in Futtergräsern

4.2.1 *Festuca arundinacea*

Ein Beispiel für einen massiven Befall von *F. arundinacea* mit Mutterkorn ist in Abbildung 7 dargestellt. Bei Gräsern der Gattung *F. arundinacea* (n=50) betrug der Anteil positiver Proben im gruppenspezifischen Nachweis für Ergotalkaloide 62 %. Der Median lag bei 100 $\mu\text{g/kg}$ und das 75ste Perzentil betrug 600 $\mu\text{g/kg}$. Am höchsten belastet war Probe (24) mit einem Ergotalkaloidgehalt von 7.500 $\mu\text{g/kg}$.

Im Ergotamin-EIA wurden bei 96 % der Proben positive Testergebnisse ermittelt. Der Median der positiv getesteten Proben betrug 65 $\mu\text{g/kg}$. Im Konzentrationsbereich >1.000 $\mu\text{g/kg}$ befand sich lediglich eine Probe (24), die mit einem Messwert von 1.300 $\mu\text{g/kg}$ den Maximalwert für dieses Testsystem repräsentierte.

Für *F. arundinacea*-Proben betrug die Vorkommenshäufigkeit positiver Proben im Testsystem für α -Ergocryptin und Ergocornin 92 %. Im α -Ergocryptin-EIA betrug der Median 1.950 $\mu\text{g/kg}$, das 75ste Perzentil lag bei 5.275 $\mu\text{g/kg}$. Das höchste Messergebnis wurde für Probe (15) ermittelt (29.100 $\mu\text{g/kg}$), bei Probe (18) war der ermittelte Messwert ebenfalls sehr hoch (20.400 $\mu\text{g/kg}$).

Nach der Untersuchung der Proben im Enzymimmuntest für Ergocornin wurden zumeist sehr hohe Messwerte ermittelt. Der Median betrug 13.250 $\mu\text{g/kg}$. Der Maximalwert für den Ergocornin-EIA wurde in Probe (25) ermittelt (78.800 $\mu\text{g/kg}$). Mit einem Wert von 45.500 $\mu\text{g/kg}$ erzielte Probe (15) das zweithöchste Ergebnis in diesem Testsystem. Diese Probe enthielt auch den Maximalwert für α -Ergocryptin und tendenziell hohe Messwerte im

Ergotamin-EIA sowie im „Generic Ergot Alkaloid“-EIA.

4.2.2 *Lolium perenne*

In Abbildung 6 ist ein Beispiel für einen sichtbaren Mutterkornbefall von *L. perenne* dargestellt. Bei Gräsern der Gattung *L. perenne* (n=47) betrug die Vorkommenshäufigkeit positiver Proben im gruppenspezifischen Nachweis für Ergotalkaloide 87 %. Die Messwerte lagen im Konzentrationsbereich von 40–28.600 µg/kg, der Median betrug 500 µg/kg. Damit übertrafen die Messwerte in diesem Testsystem für *L. perenne* deutlich die Ergebnisse von *F. arundinacea*-Gräsern im gleichen Testsystem. Dies wurde auch am 75sten Perzentil (4.100 µg/kg) deutlich.

Im Testsystem für Ergotamin betrug der Anteil positiver Proben für *L. perenne* 96 %. Der Median (200 µg/kg) und das 75ste Perzentil (650 µg/kg) lagen deutlich oberhalb derer, die für *F. arundinacea*-Proben im gleichen Enzymimmuntest nachgewiesen wurden. Der höchste Messwert wurde bei Probe (72) ermittelt (2.400 µg/kg). Diese Probe erzielte auch Maximalwerte in allen weiteren angewendeten Testsystemen.

Im α-Ergocryptin-EIA wurden für fast alle *L. perenne*-Proben (96 %) positive Messwerte ermittelt. Der Median betrug im Testverfahren für α-Ergocryptin 3.400 µg/kg, das 75ste Perzentil betrug 7.750 µg/kg. Der Maximalwert lag bei 45.300 µg/kg in Probe (72). Das Ergebnis im α-Ergocryptin-EIA fiel mit 24.300 µg/kg für Probe (77) ebenfalls sehr hoch aus. Für Probe (77) ergaben sich tendenziell hohe Messwerte auch im gruppenspezifischen Nachweis (17.200 µg/kg) sowie im EIA für Ergotamin (1.400 µg/kg) und Ergocornin (27.100 µg/kg).

Nach Untersuchung der Grasproben im Testsystem für Ergocornin wurden bei 87 % positive Ergebnisse ermittelt. Der Maximalwert (82.600 µg/kg) wurde in Probe (72) festgestellt. Im Vergleich mit dem ermittelten Maximum für *F. arundinacea* im gleichen Testsystem wurde das Ergebnis damit um nahezu 4.000 µg/kg übertroffen. In Tabelle 14 sind die Testergebnisse der Enzymimmuntests für *F. arundinacea* und *L. perenne* dargestellt.

Tab. 14: Testergebnisse von *F. arundinacea* und *L. perenne* im „Generic Ergot Alkaloid“-EIA und in den EIA's für Ergotamin, α -Ergocryptin und Ergocornin

	Messwert ($\mu\text{g/kg}$) im EIA für			
	Generic Ergot Alkaloid	Ergotamin	α -Ergocryptin	Ergocornin
FA (n=50)				
n pos	31	48	46	46
% pos	62	96	92	92
MW	960	160	4.000	15.900
Min	40	20	300	2.400
Max	7.500	1.300	29.100	78.800
LP (n=47)				
n pos	41	45	45	41
% pos	87	96	96	87
MW	3.220	460	5.700	9.700
Min	40	20	500	2.000
Max	28.600	2.400	45.300	82.600

FA: *Festuca arundinacea*; LP: *Lolium perenne*

MW: Mittelwert; Min: Minimalwert; Max: Maximalwert; pos: positiv; n: Anzahl

4.2.3 Sonstige *Poaceae*

Die Untersuchung umfasste die Gattungen *Dactylus glomerata* (Knäuelgras), *Alopecurus pratensis* (Wiesen-Fuchsschwanzgras) und *Plantago major* (Wegerich). Die Einzelergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tab. 15: Testergebnisse von *D. glomerata*, *A. pratensis* und *P. major* im „Generic Ergot Alkaloid“-EIA und im EIA für Ergotamin, α -Ergocryptin und Ergocornin

	Messwert ($\mu\text{g/kg}$) im EIA für			
	Generic Ergot Alkaloid	Ergotamin	α -Ergocryptin	Ergocornin
DG (n=3)				
n pos	1	2	3	1
% pos	33	66	100	33
MW	200	165	1.566,7	3.900
Min	200	30	800	3.900
Max	200	300	3000	3.900
AP (n=2)				
n pos	1	2	2	1
% pos	50	100	100	50
MW	300	20	850	4.300
Min	300	20	600	4.300
Max	300	20	1.100	4.300
PM (n=2)				
n pos	0	2	2	1
% pos		100	100	50
MW		20	1.850	5.700
Min		20	900	5.700
Max		20	2.800	5.700

DG: *Dactylus glomerata*; AP: *Alopecurus pratensis*; PM: *Plantago major*

MW: Mittelwert; Min: Minimalwert; Max: Maximalwert; pos: positiv; n: Anzahl

4.2.4 Ergotalkaloidgehalte in verschiedenen Pflanzengeweben

Die Untersuchung von Blättern wurde durchgeführt, um eine Kontamination mit externem Mutterkorn auszuschliessen. Das Probenmaterial wurde daher visuell selektiert.

4.2.4.1 *Festuca arundinacea*

Nach Untersuchung der Blätter (n=18) von Gräsern der Gattung *F. arundinacea* betrug die Vorkommenshäufigkeit positiver Ergebnisse für das Testsystem des „Generic Ergot Alkaloid“-EIA 61 %. Der Median lag bei 100 µg/kg und der Maximalwert betrug in dieser Probengruppe 350 µg/kg.

Bei 94 % der untersuchten Blätterproben wurden im Ergotamin-EIA positive Testergebnisse festgestellt. Die Messwerte lagen im Konzentrationsbereich von 20–200 µg/kg, der Median und das 75ste Perzentil betrugen 100 µg/kg.

Im Testsystem für α -Ergocryptin wurden bei zwei Blätterproben Ergebnisse unterhalb der Nachweisgrenze ermittelt. Der Maximalwert betrug 13.800 µg/kg und der Median lag bei 4.600 µg/kg.

Bei der Untersuchung von *F. arundinacea*-Blättern im Ergocornin-EIA wurden zwei Testergebnisse unterhalb der Nachweisgrenze festgestellt. Die positiven Testergebnisse bewegten sich im Konzentrationsbereich von 2.400–75.200 µg/kg. Der Median lag in den Proben bei 8.550 µg/kg, der Mittelwert betrug 14.175 µg/kg.

Blütenproben von *F. arundinacea* (n=2) ergaben im „Generic Ergot Alkaloid“-EIA in beiden Fällen einen Messwert unterhalb der Nachweisgrenze. Eine der Proben zeigte sowohl im „Generic Ergot Alkaloid“-EIA als auch im Testsystem für Ergotamin und α -Ergocryptin einen Messwert, der kleiner als die Nachweisgrenze war. Für die andere Blütenprobe wurde im Ergotamin-EIA ein Ergebnis von 30 µg/kg und für α -Ergocryptin ein Ergebnis von 900 µg/kg festgestellt. Es wurden keine Blütenproben mit dem Enzymimmuntest für Ergocornin untersucht.

4.2.4.2 *Lolium perenne*

Bei Blättern (n=15) von Gräsern der Gattung *L. perenne* betrug die Vorkommenshäufigkeit positiver Ergebnisse im „Generic Ergot Alkaloid“-EIA 73 %. Die Messwerte lagen im Konzentrationsbereich von 40–200 µg/kg. Im Vergleich mit Blätterproben von *F. arundinacea* war der Maximalwert damit geringer, die Minimalwerte waren hingegen einheitlich. Der Median betrug für *F. arundinacea*-Blätter im genannten Testsystem 100 µg/kg.

Die Untersuchungen im Testsystem für Ergotamin ergaben bei 86,6 % der Proben positive Messwerte. Die insgesamt relativ geringe Toxinbelastung (Konzentrationsbereich 20–100 µg/kg) zeigt sich auch im Median, der 30 µg/kg betrug.

Im α-Ergocryptin-EIA wurde mit Ausnahme von einer Probe für alle weiteren ein positives Testergebnis ermittelt. Der Minimalwert betrug 1.300 µg/kg. Er war damit mehr als dreimal so hoch wie der Minimalwert, der im gleichen Testsystem bei *F. arundinacea*-Blättern nachgewiesen wurde. In der Höhe des Maximalwertes entsprachen sich die Blätterproben beider Grasarten weitgehend.

Im Testsystem für Ergocornin betrug der Anteil positiver Blätterproben 80 %. Der Konzentrationsbereich erstreckte sich von 2.000–9.800 µg/kg. Der Mittelwert lag bei 5.050 µg/kg, der Median betrug 4.700 µg/kg.

Nach Untersuchung der Blüten (n=2) von Gräsern der Gattung *L. perenne* im „Generic Ergot Alkaloid“-EIA betrugen die Testergebnisse 1.500 µg/kg und 3.700 µg/kg. Im Ergotamin-EIA lagen der Median und der Mittelwert bei 950 µg/kg. Im α-Ergocryptin-EIA wurde für die untersuchten Blütenproben ein Median/Mittelwert in Höhe von 2.950 µg/kg ermittelt. Blüten von *L. perenne* wurden nicht mit dem Testsystem für Ergocornin untersucht.

4.2.5 Saisonale Belastungssituation

Ein Teilaspekt der Arbeit war die Untersuchung von Gräsern der Gattung *L. perenne* und *F. arundinacea* zu unterschiedlichen Jahreszeiten. Die Untersuchung diente der Überprüfung

einer möglichen Belastung von Gräsern mit Ergotalkaloiden durch Endophyten. Die grundlegende Hypothese hierbei war, dass im Frühjahr eine Kontamination des Grasmaterials durch *Claviceps spp.* weitgehend auszuschließen sein müsste und positive Nachweise für Ergotalkaloide somit ausschließlich auf Endophyten zurückzuführen sein müssten. In die Auswertung wurden nur solche Proben einbezogen, die in beiden Vegetationsperioden an jeweils identischen Standorten zu gewinnen waren. Messwerte von Gräsern der Vegetationsperiode I (Sommer 2007) beziehen sich auf die Blätter, Blüte und den Halm einer Probe. Untersuchungsergebnisse aus Vegetationsperiode II (Frühjahr 2008) beziehen sich entsprechend dem jahreszeitlichen Entwicklungsstand des Grases nur auf dessen Blätter. Bei der Betrachtung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass Grasproben des Frühjahres 2008 nicht immer eindeutig der Gattung *L. perenne* oder *F. arundinacea* zuzuordnen waren.

4.2.5.1 *Festuca arundinacea*

In die Untersuchungen wurden insgesamt 12 Gräserproben einbezogen. Der Anteil positiver Proben im „Generic Ergot Alkaloid“-EIA betrug in Vegetationsperiode I (Sommer 2007) 83,3 % und in Vegetationsperiode II (Frühjahr 2008) 50 %. Ein untersuchtes „Probenpaar“ ergab im Testsystem des „Generic Ergot Alkaloid“-EIA sowohl in Vegetationsperiode I als auch in Vegetationsperiode II ein Ergebnis unterhalb der Nachweisgrenze. Zwei weitere Grasproben ergaben für dieses Testsystem in Vegetationsperiode II ein negatives Ergebnis, stellten sich in Vegetationsperiode I mit 730 µg/kg und 50 µg/kg jedoch als kontaminiert dar. In Bezug auf den Median von Vegetationsperiode II (Frühjahr 2008) (100 µg/kg) gegenüber dem der Vegetationsperiode I (Sommer 2007) (600 µg/kg) zeigte sich eine geringere Belastung von Gräsern des Frühjahres gegenüber denen der Sommerzeit.

Im Enzymimmuntest für Ergotamin und α -Ergocryptin betrug der Anteil positiver Proben in beiden Vegetationsperioden 100 %. Im Testsystem für Ergotamin wurde für ein Probenpaar mit 30 µg/kg ein in beiden Vegetationsperioden übereinstimmendes Ergebnis festgestellt. In drei der verbleibenden fünf Paarungen konnte in den Sommergräsern ein höheres Testergebnis als in Gräsern des Frühjahres festgestellt werden.

Alle Grasproben-Paare zeigten im Testsystem für α -Ergocryptin höhere Messwerte in Gräsern des Frühjahres (Konzentrationsbereich 3.500-11.800 µg/kg) als in Gräsern, die im Sommer gesammelt worden waren (Konzentrationsbereich 1.000-6.700 µg/kg).

Der Anteil positiver Testergebnisse im Ergocornin-EIA betrug 100 % in Vegetationsperiode I und 83,3 % in Vegetationsperiode II. In diesem Testsystem erzielte eine Grasprobe der Vegetationsperiode I (Sommer 2007) ein Testergebnis von 16.300 µg/kg, das Testergebnis von der am gleichen Standort gewonnenen Probe aus Vegetationsperiode II (Frühjahr 2008) war jedoch unterhalb der Nachweisgrenze. Sowohl im Vergleich der Mediane (11.800 µg/kg VP I; 6.000 µg/kg VP II) als auch hinsichtlich des 75sten Perzentils (16.375 µg/kg VP I; 8.575 µg/kg VP II) wurden im Ergocornin-EIA höhere Messwerte für *F. arundinacea*-Proben der ersten Vegetationsperiode festgestellt.

4.2.5.2 *Lolium perenne*

Die saisonale Belastung von *L. perenne*-Gräsern wurde anhand von zehn Pflanzen dieser Gattung untersucht. Sie wurden zu fünf Probenpaaren mit jeweils gleichen Standorten in Vegetationsperiode I (Sommer 2007) und Vegetationsperiode II (Frühjahr 2008) gruppiert.

Nach der Untersuchung der Gräser im gruppenspezifischen Nachweis für Ergotalkaloide wurden in 100 % der Sommergräser und in 80% der Gräser des Frühjahres Ergotalkaloide nachgewiesen. Der einzigen negativ getesteten Grasprobe aus Vegetationsperiode II (Frühjahr 2008) steht die Vergleichsprobe der ersten Vegetationsperiode mit einem Messwert von 3.800 µg/kg gegenüber. Die vier verbleibenden Proben zeigten in Vegetationsperiode II alle geringere Testergebnisse als in Vegetationsperiode I, was auch anhand des Mittelwertes (3.300 µg/kg VP I; 70 µg/kg VP II) (Abb. 16) und des Medians (3.500 µg/kg VP I; 70 µg/kg VP II) deutlich wurde.

Im Enzymimmuntest für Ergotamin wurden in 100 % der Proben beider Jahreszeiten positive Ergebnisse ermittelt. Die Messwerte aller Frühjahrsproben (Konzentrationsbereich 20–100 µg/kg) lagen deutlich unterhalb der Messwerte der Sommerproben (Konzentrationsbereich 200–2.000 µg/kg). Diese Tendenz zeigte sich auch im Median und im 75sten Perzentil.

Die Untersuchung im Testsystem für α -Ergocryptin ergab für alle Proben beider Vegetationsperioden positive Messergebnisse. Innerhalb dieses Testsystems wurden für *L. perenne* erstmals höhere Messwerte für Pflanzen des Frühjahres gegenüber denen des Sommers festgestellt. Die Messwerte im α -Ergocryptin-EIA lagen bei Frühjahrsgräsern

zwischen 2.200 µg/kg und 10.500 µg/kg, der Median betrug 6.200 µg/kg.

Im Ergocornin-EIA betrug der Anteil positiver Proben in Vegetationsperiode I 100 % und in Vegetationsperiode II 80 %. Der negativ getesteten Probe des Frühjahres kann die entsprechende Vergleichsprobe des Sommers mit einem Messwert von 6.200 µg/kg gegenüber gestellt werden. Für alle weiteren Proben der zweiten Vegetationsperiode wurden geringere Messwerte als für die Vergleichsproben des Sommers festgestellt.

In Abbildung 16 ist die Ergotalkaloidbelastung für *F. arundinacea* und *L. perenne* in beiden Vegetationsperioden abgebildet.

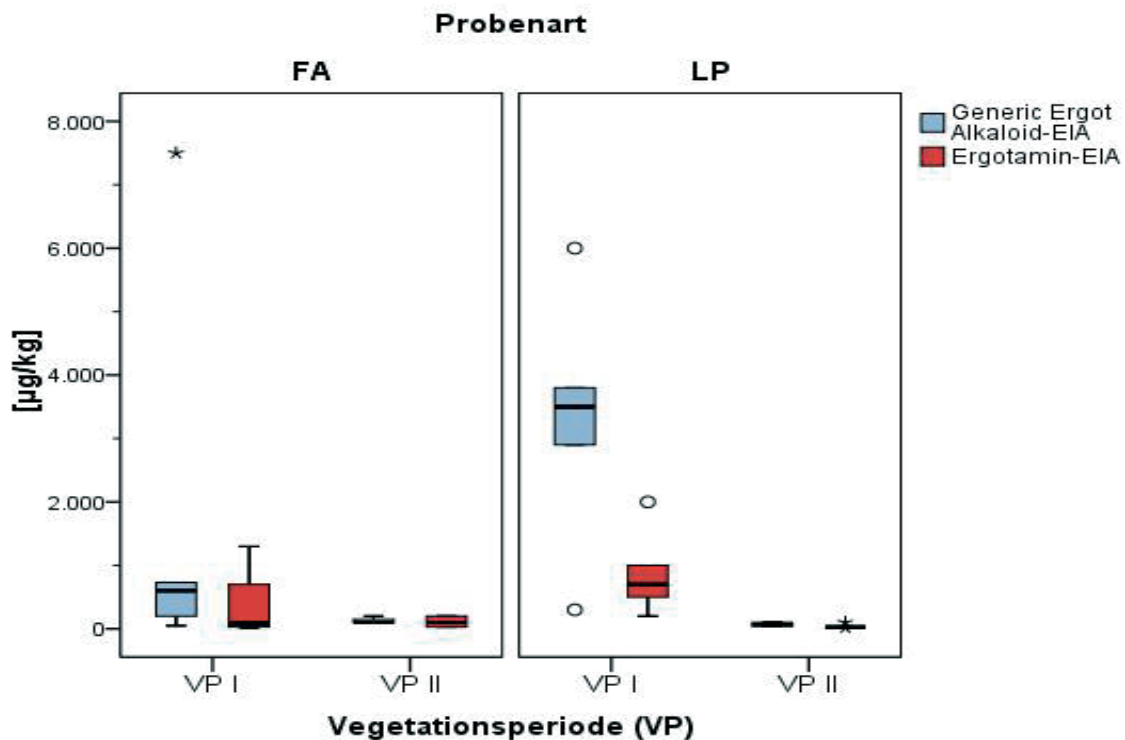


Abb. 16: Ergotalkaloidbelastung in standortidentischen *F. arundinacea*- (FA) und *L. perenne*- (LP) Gräsern über den Zeitraum von zwei Vegetationsperioden (Sommer 2007 (VPI) bzw. Frühjahr 2008 (VP II)). Extremwerte (Werte, die mehr als drei Interquartilsabstände vom benachbarten Kastenrand entfernt liegen) werden in Form von Sternen ausgewiesen. Ausreißer (Werte, die mehr als 1,5-3 Interquartilsabstände vom benachbarten Kastenrand entfernt liegen) werden als Kreise dargestellt. Ausreißer und Extremwerte gingen nicht in die Berechnung der übrigen dargestellten Maßzahlen ein.

4.2.6 Regionale Belastungssituation

4.2.6.1 *Festuca arundinacea*

Die Kontaminationshäufigkeit von *F. arundinacea*-Proben mit Ergotalkaloiden in verschiedenen Regionen Deutschlands ist in Tabelle 16 dargestellt.

Tab. 16: Verteilung der positiven Testergebnisse der Enzymimmuntests nach geographischer Herkunft (*F. arundinacea*)

Herkunft	Probenanzahl	<u>Anzahl positiver Ergebnisse im EIA für</u>			
		Generic Ergot Alkaloid	Ergotamin	α -Ergocryptin	Ergocornin
Nordrhein-Westfalen	44	27	42	41	40
Hessen	5	3	5	4	5
Baden-Württemberg	1	1	1	1	1

n=50

Die größte Probenanzahl in dieser Studie stammte aus unterschiedlichen Regionen Nordrhein-Westfalens. Der Anteil positiver Testergebnisse lag für *F. arundinacea*-Proben im Testsystem des „Generic Ergot Alkaloid“-EIA bei 61,3 %. Der Minimalwert betrug 40 µg/kg, die maximale Konzentration lag bei 7.500 µg/kg.

Für Nordrhein-Westfalen betrug der Anteil positiver Proben im Testsystem für Ergotamin 95,4 %. Der Mittelwert lag bei 181 µg/kg. Der Median und der Maximalwert betrugen 65 µg/kg und 1.300 µg/kg. Nach der Untersuchung der Grasproben im α -Ergocryptin-EIA ergaben sich Messwerte im Konzentrationsbereich von 300-29.100 µg/kg. Die nordrhein-westfälischen *F. arundinacea*-Proben erzielten im EIA für Ergocornin im Vergleich zu Proben aus Hessen und Baden-Württemberg mit 78.800 µg/kg die höchste maximale Konzentration.

F. arundinacea-Proben (n=5) aus Hessen wurden mit allen vier Testverfahren untersucht. Bei der Untersuchung der Gräser im gruppenspezifischen Nachweis für Ergotalkaloide wurden bei 60 % der Proben positive Ergebnisse gemessen. Die Messwerte lagen im Konzentrationsbereich von 70-100 µg/kg. Im Testsystem für Ergotamin ergaben alle Proben ein Testergebnis oberhalb der Nachweisgrenze. Der Mittelwert und der Median betrugen im Ergotamin-EIA 74 µg/kg bzw. 30 µg/kg. Der Maximalwert lag bei 200 µg/kg. Bei der Untersuchung der Proben im α-Ergocryptin-EIA wurden bei 80 % der Proben positive Ergebnisse gemessen. Im Ergocornin-EIA betrug der Mittelwert 11.440 µg/kg. Der Median lag bei 12.600 µg/kg und der Maximalwert betrug im Ergocornin-EIA 15.900 µg/kg.

Die einzige aus Baden-Württemberg stammende Probe ergab in allen Testsystemen ein positives Ergebnis. Die ermittelten Werte betrugen 50 µg/kg im Generic-Ergot-Alkaloid“-EIA, 100 µg/kg im Ergotamin-EIA und 2.600 µg/kg im α-Ergocryptin-EIA. Im Testsystem für Ergocornin betrug das Ergebnis 4.900 µg/kg.

4.2.6.2 *Lolium perenne*

Tabelle 17 zeigt eine Auswertung positiver Testergebnisse in Abhängigkeit von der geographischen Herkunft von Gräsern der Gattung *L. perenne*.

Tab. 17: Verteilung der positiven Testergebnisse der Enzymimmuntests nach geographischer Herkunft (*L. perenne*)

Herkunft	Probenanzahl	<u>Anzahl positiver Ergebnisse im EIA für</u>			
		Generic Ergot Alkaloid	Ergotamin	α-Ergocryptin	Ergocornin
Nordrhein-Westfalen	44	38	43	42	38
Hessen	2	2	1	2	2
Baden-Württemberg	1	1	1	1	1

n=47

Insgesamt wurden 44 Proben aus Nordrhein-Westfalen in die verschiedenen Testsysteme eingesetzt. Bei der Untersuchung der Proben im „Generic Ergot Alkaloid“-EIA betrug der Anteil positiver Testergebnisse 86,3 %. Die Messwerte lagen im Konzentrationsbereich von 40–28.600 µg/kg. Damit lag der Maximalwert für dieses Testsystem in Nordrhein-Westfalen deutlich über denen aus Hessen und Baden-Württemberg. Im Testsystem für Ergotamin betrug der Anteil positiver Proben 97,7 %. Der Mittelwert lag bei 487,7 µg/kg. Der Median und der Maximalwert betrugen für diesen Enzymimmuntest 200 µg/kg und 2.400 µg/kg. Für die im α-Ergocryptin-EIA untersuchten Proben betrug der Mittelwert 5.189 µg/kg. Der Median betrug 3.250 µg/kg und der Maximalwert lag bei 45.300 µg/kg. Im Testsystem für Ergocornin betrug der Anteil positiver Messergebnisse 86,3 %.

Zwei Proben wurden aus dem Bundesland Hessen gewonnen. Mit Ausnahme von Ergotamin, das nur in einer Probe nachgewiesen werden konnte, wurden in den verbleibenden drei Testsystemen für beide Proben ausschließlich positive Ergebnisse nachgewiesen. Im gruppenspezifischen Nachweis für Ergotalkaloide wurden für die beiden Grasproben Messwerte von 40 µg/kg bzw. 100 µg/kg bestimmt.

Für die aus Baden-Württemberg stammende *L. perenne*-Probe wurde in allen vier Testsystemen eine Ergotalkaloidbelastung oberhalb der Nachweisgrenze ermittelt. Das im gruppenspezifischen Nachweis für Ergotalkaloide erzielte Ergebnis betrug 100 µg/kg. Die weiteren Untersuchungsergebnisse betrugen für die Probe aus Baden-Württemberg: 40 µg/kg im Ergotamin-EIA, 3.100 µg/kg im α-Ergocryptin-EIA und 6.300 µg/kg im Ergocornin-EIA.

4.3 Ergebnisse der Hochdruckflüssigkeitschromatographie für den Nachweis von Ergotalkaloiden in Futtergräsern

4.3.1 *Festuca arundinacea*

Bei der Darstellung der Untersuchungsergebnisse von Gräsern der Gattung *F. arundinacea* (n=5) wurde zwischen Proben unterschieden, die aus Blättern, Blüten und Halmen bestanden, und einer Probe, die sich nur aus Blättern zusammensetzte (Anhang 4). Die Gesamtergotalkaloidbelastung der untersuchten Pflanzen, bestehend aus Blättern, Blüten und Halmen, ergab einen Minimalwert von 90 µg/kg und einen Maximalwert von 9900 µg/kg. Der Median betrug 572 µg/kg und das 75ste Perzentil lag bei 7.640 µg/kg (Abb. 17).

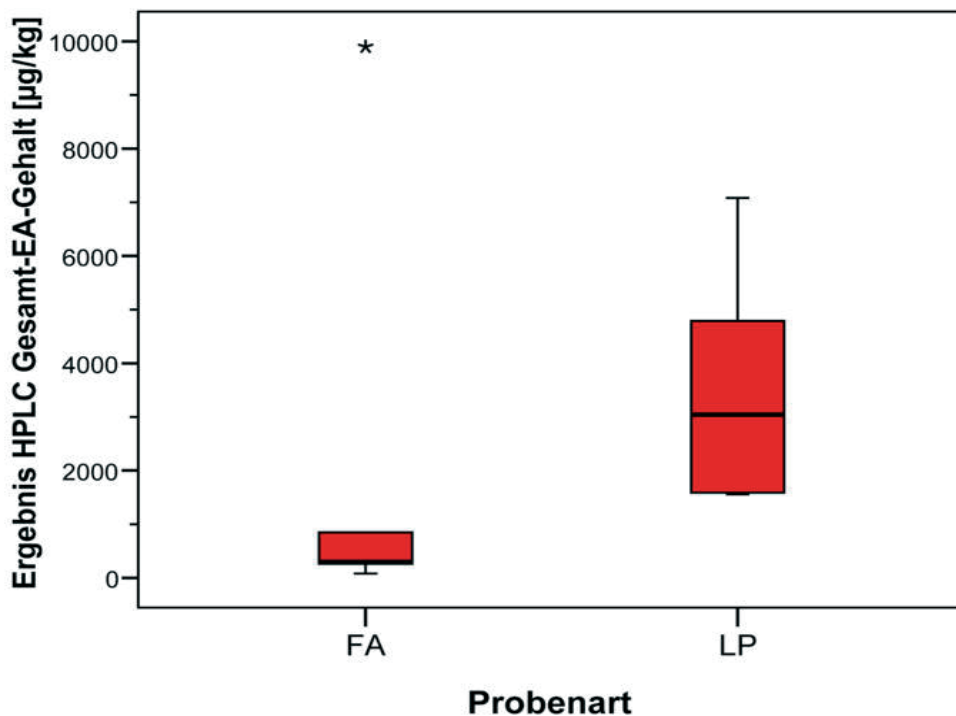


Abb. 17: Auswertung (Box-Plot) der mittels HPLC bestimmten Gesamtergotalkaloidgehalte in *F. arundinacea* und *L. perenne*. Minimum und Maximum werden durch die Begrenzung der Striche nach unten und oben gekennzeichnet. Der Median wird durch den Balken im Inneren der Box dargestellt. Die untere und obere Kastenbegrenzung entspricht dem 25sten und 75sten Perzentil. Extremwerte (Werte, die mehr als drei Interquartilsabstände vom benachbarten Kastenrand entfernt liegen) werden in Form von Sternen ausgewiesen. Diese gingen nicht in die Berechnung der übrigen dargestellten Maßzahlen ein.

Die Zusammensetzung der einzelnen Gesamtergotalkaloidgehalte war durch eine erhebliche Variabilität gekennzeichnet, die durch die unterschiedliche Gewichtung der Ergotalkaloide in den Proben verdeutlicht wurde. Exemplarisch kann dies am Ergometrin erläutert werden, dessen Anteil am Gesamtergotalkaloidgehalt in Probe (25) 37,5 % betrug. In Probe (2) betrug der Anteil von Ergometrin am Gesamtergotalkaloidgehalt hingegen 1,9 %. Auch durch Addition der Ergebnisse von den Isomerenpaaren der jeweiligen Ergotalkaloide wurde keine Veränderung der Variabilität festgestellt. In jeder der Proben wurde Ergometrin/-inin, Ergosin, Ergotamin und α -Ergocryptinin nachgewiesen. Die verbleibenden neun Ergotalkaloide wurden nur vereinzelt in den Proben detektiert. Die Ergotalkaloidbelastung der analysierten Gräserextrakte wurde basierend auf dem Median von α -Ergocryptin > Ergocornin > Ergosin > Ergocristin dominiert. In drei der vier untersuchten Gräserproben überwogen die Anteile der *-in*-Formen gegenüber dem Anteil der *-inine* mit bis zu 87,8 % Anteil an der Gesamtergotalkaloidbelastung. Lediglich Probe (1) wies einen höheren Anteil an Isolysergsäureisomeren auf. Dieser Unterschied kann mit dem Vorkommen von

Ergometrinin erklärt werden, welches mit einem Anteil von 44 % am Gesamtalkaloidgehalt das dominierende Ergotalkaloid in dieser Probe war.

Probe (35) setzte sich nur aus Blättern zusammen. Mit einem Gesamtalkaloidgehalt von 260 µg/kg konnte keine erwähnenswerte Über-/Unterschreitung gegenüber Proben festgestellt werden, die aus Blättern, Blüten und Halmen bestanden. Der ermittelte Gesamtmesswert entsprach in seiner Höhe weitgehend Probe (25), bei der das gesamte Pflanzenmaterial untersucht wurde. Mit einem Messwert von 109 µg/kg besaß Ergosinin den größten Anteil am Gesamtergotalkaloidgehalt. Der Minimalwert betrug 7,4 µg/kg für α -Ergocryptinin. Generell dominierten in Probe (35) in Bezug auf die Ergotalkaloid-Gesamtbelastung die Lysergsäureformen mit 58,6 % gegenüber den Isolysergsäureisomeren. Dies lässt sich mit dem vergleichsweise hohen Anteil von Ergosinin am Gesamtergotalkaloidgehalt begründen. Insgesamt wurden mit der HPLC-Methode in Probe (35) sieben von 14 Ergotalkaloiden nachgewiesen.

In den Abbildungen 18 und 19 sind charakteristische HPLC-Chromatogramme für mit Ergotalkaloiden kontaminierte *F. arundinacea*-Proben dargestellt.

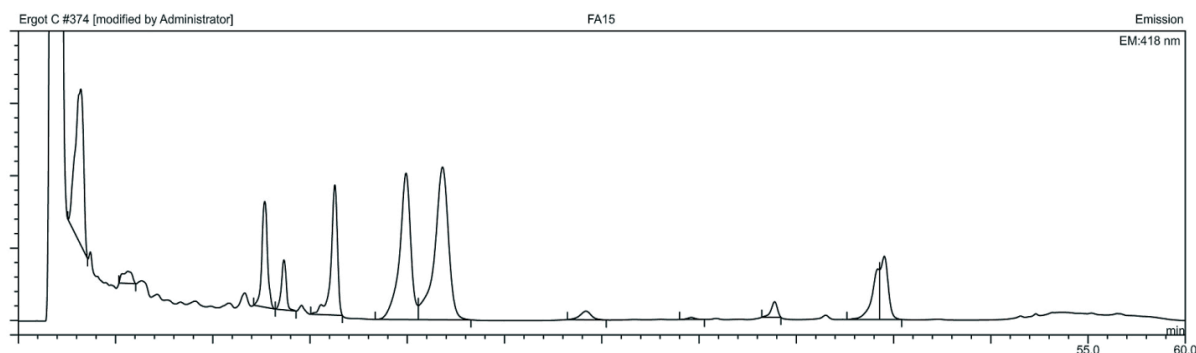


Abb. 18: Chromatogramm einer mit Ergotalkaloiden natürlich kontaminierten *F. arundinacea*-Probe (15). Die Summe der Ergotalkaloide betrug 9.900 µg/kg. Bezüglich der Einzelalkaloide sei auf Anhang 4 verwiesen. Die Retentionszeiten der Einzelalkaloide sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

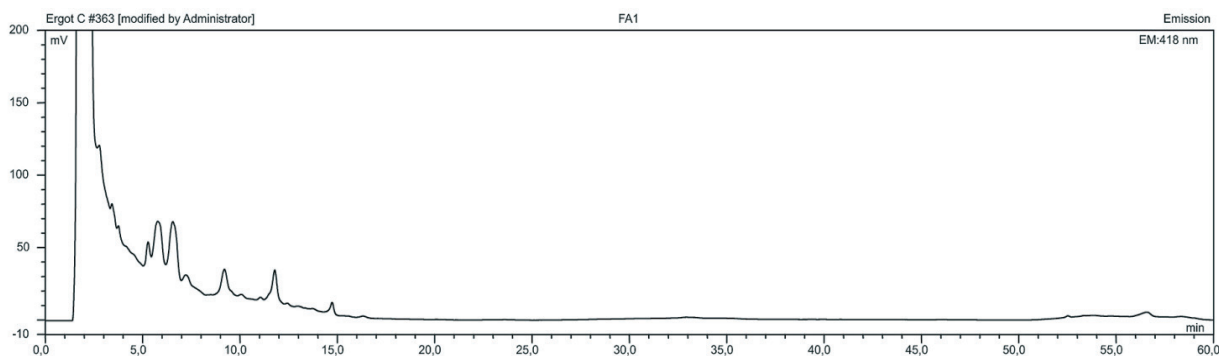


Abb. 19: Chromatogramm einer mit Ergotalkaloiden niedrig belasteten *F. arundinacea*-Probe (1). Die Summe der Ergotalkaloide betrug 79 µg/kg. Bezüglich der Einzelalkaloide sei auf Anhang 4 verwiesen. Die Retentionszeiten der Einzelalkaloide sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

4.3.2 *Lolium perenne*

Die Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen für Gräser der Gattung *L. perenne* (n=6) sind in Anhang 4 zusammengestellt. Alle Proben setzten sich aus Blättern, Blüten und Halmen zusammen. Abbildung 20 zeigt ein HPLC-Chromatogramm einer natürlich mit Ergotalkaloiden kontaminierten *L. perenne*-Probe.

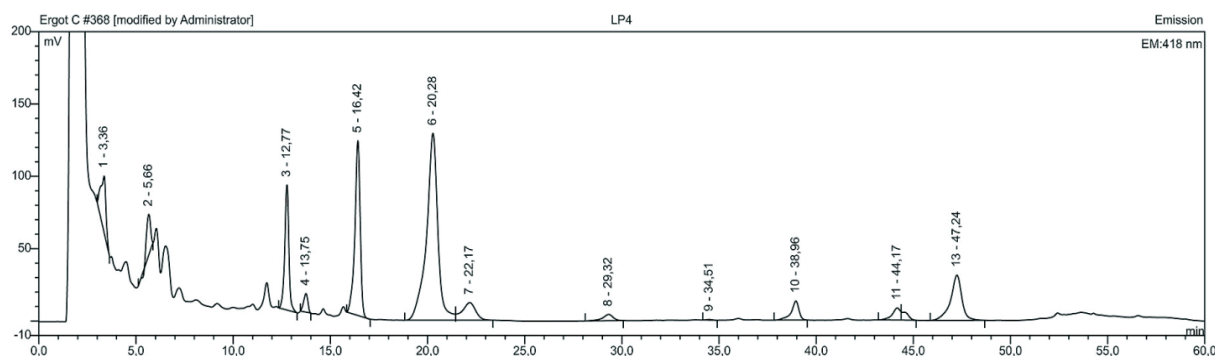


Abb. 20: Chromatogramm einer mit Ergotalkaloiden natürlich kontaminierten *L. perenne*-Probe (54). Die Summe der Ergotalkaloide betrug 7.082 µg/kg. Bezüglich der Einzelalkaloide sei auf Anhang 4 verwiesen. Die Retentionszeiten der Einzelalkaloide sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Nach Auswertung der Gesamtergotalkaloidgehalte aller untersuchten Proben wurde ein Median von 3.040 µg/kg und ein 75stes Perzentil von 5.400 µg/kg bestimmt. Das 25ste Perzentil betrug 1.600 µg/kg (Abb.17). Der Anteil der Ergotalkaloide, die in allen Proben detektiert wurden, betrug 50 %. Ergocristin wurde lediglich in zwei Proben bestimmt. Einzig

in Probe (61) wurden alle 14 Ergotalkaloide anhand des HPLC-Verfahrens ermittelt. Die Höhe der einzelnen Ergotalkaloidbelastungen in den Proben reduzierte sich basierend auf den Medianen von α -Ergocryptin > Ergocristinin > Ergosin > Ergocornin. Die Zusammensetzung der Gesamtergotalkaloidgehalte erwies sich auch bei *L. perenne*-Gräsern als variabel. Exemplarisch betrug der Anteil von Ergotamin am Gesamtergotalkaloidgehalt in Probe (52) 1,5 %, in Probe (55) hingegen 28 %. Nach Auswertung der Vorkommenshäufigkeit der *-in/-inin*-Formen betrugen diese in einer Probe (61) jeweils 50 %. In vier der Grasproben wurden Ergotalkaloide mit einem Anteil von 53,8 % vorwiegend über *-inin*-Formen repräsentiert. In Abbildung 21 ist die quantitative Auswertung der mittels HPLC analysierten Proben dargestellt.

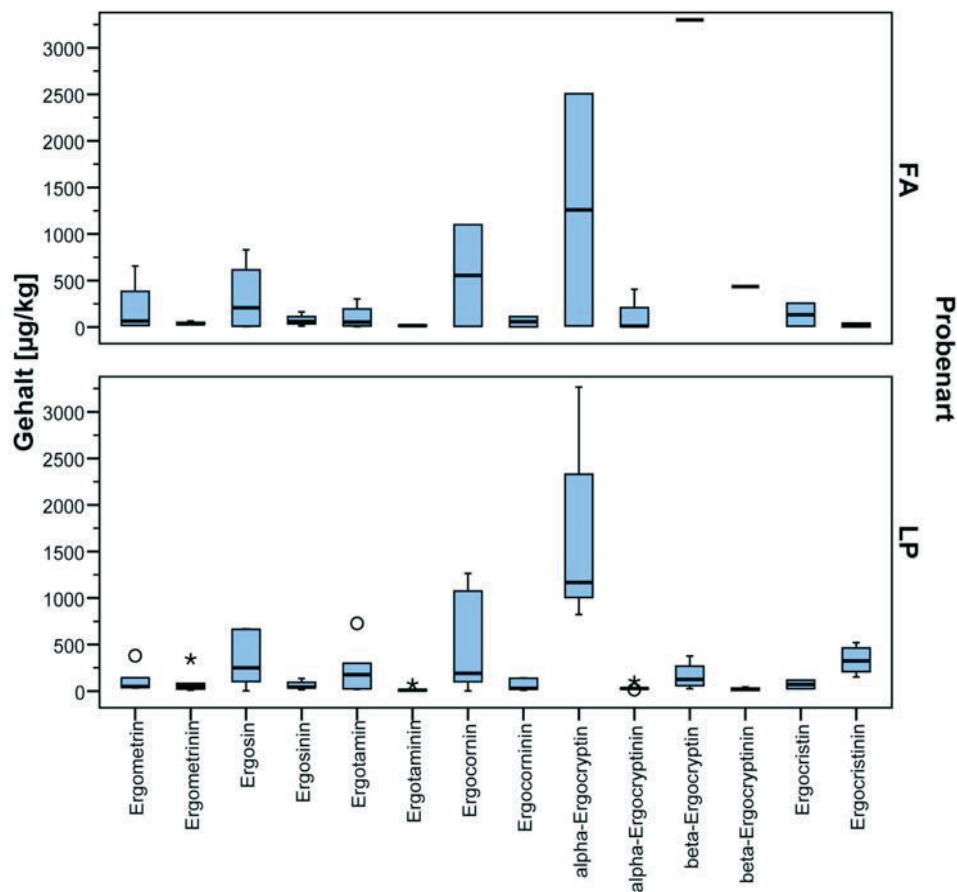


Abb. 21: Auswertung (Box-Plot) der mittels HPLC bestimmten Einzelergotalkaloidgehalte in *F. arundinacea* und *L. perenne*. In der Mehrzahl der Proben dominierten α -Ergocryptin und Ergocornin. Minimum und Maximum werden durch die Begrenzung der Striche nach unten und oben gekennzeichnet. Der Median wird durch den Balken im Inneren der Box dargestellt. Die untere und obere Kastenbegrenzung entspricht dem 25sten und 75sten Perzentil. Extremwerte (Werte, die mehr als drei Interquartilsabstände vom benachbarten Kastenrand entfernt liegen) werden in Form von Sternen ausgewiesen. Ausreißer (Werte, die mehr als 1,5-3 Interquartilsabstände vom benachbarten Kastenrand entfernt liegen) werden als Kreise dargestellt. Ausreißer und Extremwerte gingen nicht in die Berechnung der übrigen dargestellten Maßzahlen ein.

4.4 Vergleichende Darstellung der Untersuchungsergebnisse von EIA und HPLC

In die statistische Auswertung möglicher Übereinstimmungen von Testergebnissen des gruppenspezifischen Nachweises für Ergotalkaloide und der HPLC gingen insgesamt neun Gräserproben ein. Diese Proben erzielten im gruppenspezifischen Nachweis für Ergotalkaloide ein positives Testergebnis und wurden anschließend mittels HPLC untersucht. Für Probe (1) von *F. arundinacea* wurde in der HPLC ein relativ niedriger Gesamtalkaloidgehalt von 79 µg/kg ermittelt. Da im „Generic Ergot Alkaloid“-EIA jedoch eine Toxinbelastung unterhalb der NWG (<40µg/kg) festgestellt wurde, wurde die Probe nicht in die Korrelationsprüfung mit einbezogen. Berücksichtigt wurden lediglich solche Proben, die aus Blättern, Blüten und Halmen bestanden. In Abbildung 22 ist die Vergleichsuntersuchung des „Generic Ergot Alkaloid“-EIA mit der HPLC dargestellt.

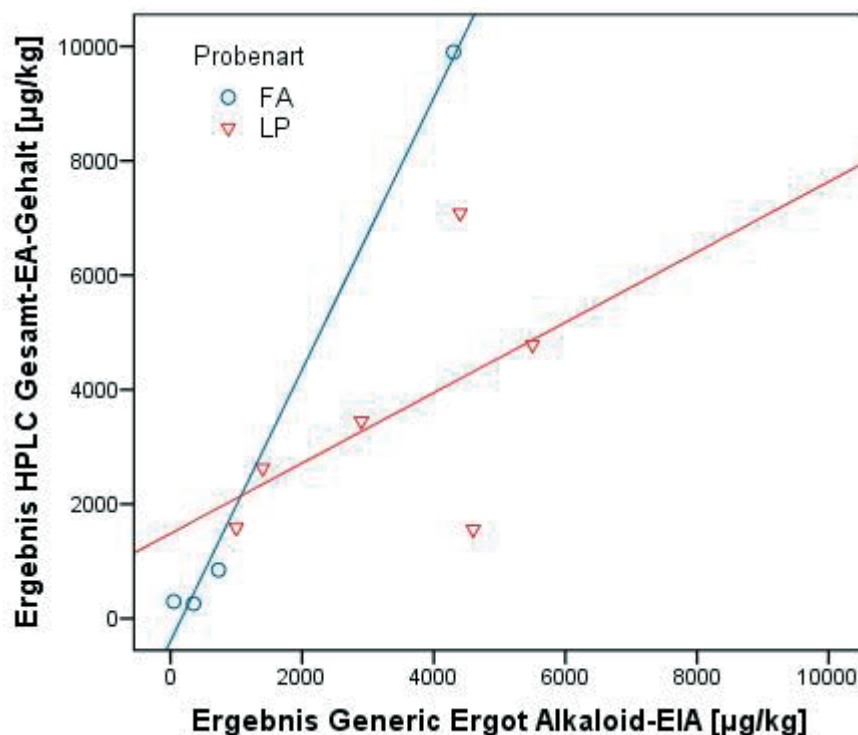


Abb. 22: Ergebnisse der Vergleichsuntersuchung zwischen dem „Generic Ergot Alkaloid“-EIA und der HPLC für natürlich kontaminierte Gräserproben (*F. arundinacea* und *L. perenne*) aus der ersten Vegetationsperiode. Die Linien zeigen jeweils die lineare Regressionsgerade.

Für *F. arundinacea*-Proben wurde ein Korrelationskoeffizient (r^2) von 0,995 ermittelt. Bei Grasproben der Gattung *L. perenne* betrug $r^2=0,529$. Generell ergab sich eine brauchbare

Übereinstimmung bezüglich der Frage, ob eine Probe hoch oder niedrig mit Ergotalkaloiden belastet war. Die qualitative Übereinstimmung wies aber erhebliche Unterschiede auf. Alle drei untersuchten Proben von *F. arundinacea* ergaben in der HPLC Messwerte, die über denen des „Generic Ergot Alkaloid“-EIA lagen. Gräser der Gattung *L. perenne* wiesen in vier von sechs Proben höhere HPLC-Messwerte als im „Generic Ergot Alkaloid“-EIA auf.

Beim Vergleich der Untersuchungsergebnisse des Enzymimmuntests und der HPLC für Ergotamin fiel auf, dass in diesem EIA in 73 % der Grasproben beider Gattungen höhere Messwerte ermittelt wurden als in der HPLC nach Addition der Messwerte von Ergotamin und Ergotaminin. In Probe FA (25) und FA (35) übertraf das Ergebnis der HPLC das des EIA um jeweils mehr als 50 %. Die Untersuchungsergebnisse differierten für Ergotamin in beiden Testverfahren im Bereich von 25–900 µg/kg. Für Probe FA (1) lagen die Ergebnisse beider Testsysteme am nächsten beeinander (Differenz EIA zu HPLC: 24,9 %), bei Probe LP (58) entsprachen sich die Testergebnisse mit einer Differenz von 29 µg/kg ebenfalls tendenziell. Mit Ausnahme von zwei *L. perenne*-Proben, bei denen die *-inin*-Form von Ergotamin in der HPLC nicht detektiert wurde, war der Anteil der *-in*-Form an der Gesamtbelastung mit Ergotamin größer als der Anteil der *-inin*-Form. Unter Berücksichtigung der Kreuzreaktionen von Ergotamin mit anderen Ergotalkaloiden wurden mögliche Veränderungen der Ergebnisse geprüft. Nach Addition der HPLC-Ergebnisse von Ergocristin/*-inin* und Ergotamin/*-inin* erhöhten sich die Ergotalkaloidgehalte um 0–520 µg/kg. In keinem Fall wurde dadurch das Testergebnis des Enzymimmuntests erreicht. In drei Proben wurde Ergocristin/*-inin* nicht ermittelt, in weiteren vier Proben nur Ergocristinin. Im Vergleich der beiden Grasspezies miteinander wurden keine relevanten Unterschiede festgestellt.

Beim Vergleich der Untersuchungsergebnisse für α -Ergocryptin wurden im enzymimmunologischen Nachweis in 90 % der Grasproben höhere Testergebnisse ermittelt als in der HPLC. Für drei *F. arundinacea*-Proben wurden in der HPLC lediglich für α -Ergocryptin Ergebnisse detektiert, nicht aber für α -Ergocryptinin. Generell überwog für α -Ergocryptin in allen Proben die Lysergsäureform in Höhe und Häufigkeit ihres Vorkommens. Um die Kreuzreaktivität von α -Ergocryptin in die Auswertung einzubeziehen, wurden die HPLC-Ergebnisse von α -Ergocryptin und β -Ergocryptin/*-inin* addiert. Für fünf der Grasproben ergaben sich dadurch keinerlei Veränderungen. Bei Probe LP (55) erhöhte sich die Ergotalkaloidbelastung um 110 µg/kg auf einen Gesamtwert von 1.266 µg/kg. Er entsprach damit weitgehend dem Testergebnis des enzymimmunologischen Nachweises für α -

Ergocryptin (1.300 µg/kg).

Beim Vergleich der Testergebnisse des Ergocornin-EIA mit den addierten Testergebnissen für Ergocornin und Ergocorninin in der HPLC betrug der Anteil der Grasproben, bei denen das EIA-Ergebnis größer war als das der HPLC, 100 %. Alle Proben, bei denen in der HPLC beide isomere Formen von Ergocornin nachgewiesen wurden, zeigten höhere Testergebnisse der *-in*-Form gegenüber der *-inin*-Form. Für Proben, die im enzymimmunologischen Verfahren für Ergocornin hohe Messwerte zeigten (FA (15), FA (25)), wurde keine vergleichbar hohe Belastung in der HPLC ermittelt. Nach Addition der Messwerte von Ergocornin/-inin und β-Ergocryptin/-inin als möglichen kreuzreaktiven Partner wurde keine Annäherung der Testergebnisse beider Untersuchungsverfahren festgestellt.

5 DISKUSSION

Mit Mutterkorn oder Endophyten besiedelte Futtergräser aus der Familie der *Poaceae* besitzen weltweite Bedeutung für Landwirtschaft und Tiergesundheit. Besondere Relevanz ist den Ergotalkaloiden zuzusprechen, auf denen das toxische Prinzip der Mutterkornvergiftung beruht und deren Konzentration und Zusammensetzung in den Sklerotien von erheblicher Variabilität gekennzeichnet ist.

Untersuchungsberichte der letzten Jahre beziehen sich insbesondere auf eine Belastung von Getreide- und Getreideerzeugnissen sowie der damit verbundenen Notwendigkeit des Verbraucherschutzes. Darüber hinaus ist bereits seit langem bekannt, dass mit Mutterkorn kontaminierte Futtermittel die Leistung und Gesundheit landwirtschaftlicher Nutztiere in unterschiedlichem Ausmaß beeinflussen können (Barnikol und Thalmann, 1986; McLeay et al., 2002). Im Sinne des Futtermittelgesetzes (FuMiG) gelten Mykotoxine als unerwünschte Stoffe, die- in oder auf Futtermitteln enthalten- eine Gefahr für die tierische Gesundheit darstellen, die Leistung von Nutztieren nachteilig beeinflussen oder als Rückstände die Qualität der von Nutztieren gewonnenen Erzeugnisse bezüglich deren Unbedenklichkeit für die menschliche Gesundheit nachteilig beeinflussen können (FuMiG, § 2 b). In § 3 des FuMiG werden zudem Verbote zur Gefahrenabwehr formuliert, die von der Herstellung bis zur Verfütterung des Futtermittels dafür Sorge tragen sollen, einen prophylaktischen Schutz der Gesundheit von Mensch und Tier zu gewährleisten. Die derzeit geltende Futtermittelverordnung (FuMiV) listet in Anlage 5 verschiedene Mykotoxine und deren Höchstgehalte auf. Für Mutterkorn ist ein Höchstgehalt von 1.000 mg/kg bezogen auf 88 v. H. Trockenmasse angegeben. Die Angabe bezieht sich auf alle Futtermittel, die unzerkleinertes Getreide enthalten.

Aktuell besteht keine Regelung für Höchstgehalte an unerwünschten Stoffen bei selbst erzeugten Futtermitteln aus Gräsern. Auch Höchstmengen für Ergotalkaloide in Futtergräsern existieren bisher nicht.

Die Aufnahme von Ergotalkaloiden über Futtergräser wird insbesondere in der Rinderhaltung praktisch nicht thematisiert, was teilweise auch auf das Fehlen von Daten zurückzuführen sein dürfte. Letztlich kann bei einer höheren Aufnahme von Ergotalkaloiden auch eine Ausscheidung der Alkaloide oder ihrer Metaboliten über die Milch vermutet werden, obwohl

auch hierzu die Datenlage als sehr unbefriedigend angesehen werden muß. De facto konnten trotz intensiver Literaturrecherchen keine publizierten Studien zum carry-over von Ergotalkaloiden in die Milch laktierender Kühe gefunden werden. Bei Monogastriern ist allerdings bekannt, dass beispielsweise Ergometrin in die Milch übergeht, weshalb bei der Frau nach Ergometringabe vom Stillen Neugeborener abgeraten wird (Novartis Pharma, 2002).

Zur Überprüfung von Ergotalkaloidgehalten in Gräsern werden verschiedene analytische Methoden angewendet. Eine führende Stellung besitzen chromatographische Verfahren, insbesondere die Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion. Diese Verfahren eignen sich zum schnellen und einfachen Routinenachweis großer Probenmengen jedoch nicht. In der Literatur sind bereits enzymimmunochemische Methoden zum Nachweis von Mutterkornalkaloiden in mit Endophyten befallenen Gräsern beschrieben und eingesetzt worden (Shelby et al., 1998; Shelby und Kelley, 1991a). Die vorliegende Arbeit orientiert sich bei ihrem methodischen Vorgehen an einem vom BMELV (2007) geförderten Forschungsprojekt, bei dem enzymimmunochemische Verfahren für Mutterkornalkaloide entwickelt wurden. Ob und in welchem Umfang Futtergräser in Deutschland mit Ergotalkaloiden belastet sind, sollte unter Verwendung dieser Verfahren untersucht werden. Des Weiteren wurde das Ziel verfolgt, die EIA-Methoden hinsichtlich ihrer Praktikabilität zum Nachweis von Ergotalkaloiden in Gräsern und ihren Einsatz für einen hohen Probendurchsatz zu bewerten.

5.1 Anwendbarkeit der EIA-Testverfahren

Die in der vorliegenden Studie zur Untersuchung von Ergotalkaloiden in Futtergräsern eingesetzten Enzymimmuntests erwiesen sich für diesen Zweck als unterschiedlich geeignet. Dem EIA für Ergocornin und α -Ergocryptin kann eine Praxistauglichkeit im Hinblick auf Testsensitivität und Testspezifität nicht zugesprochen werden.

Für Ergocornin liegt die Nachweisgrenze im EIA mit 17 ng/ml sehr hoch. Bei der Bestimmung der Wiederfindungsraten künstlich mit Ergocornin kontaminierter Proben wurden zudem nicht verwertbare Ergebnisse ermittelt, welche die eingeschränkte Eignung des Enzymimmuntests für Gräser bestätigen. Die zumeist positiven und sehr hohen Testergebnisse der Ergocornin-EIAs mit Messwerten von bis zu 82.600 µg/kg beruhen

offenbar auf einer starken Reaktivität mit einer in dem Probenmaterial enthaltenen Substanz, bei der es sich aufgrund der HPLC-Ergebnisse nicht um Ergocornin handelt. Bei der vergleichenden Überprüfung einzelner Proben mittels HPLC wurde Ergocornin nicht oder nur in geringen Mengen detektiert. Es ist zwar nicht auszuschliessen bzw. sogar einigermaßen wahrscheinlich, dass es sich hierbei um ein unbekanntes Ergotalkaloid handelt, weshalb eine weitere Identifizierung dieser kreuzreagierenden Substanz wünschenswert wäre. Vorläufig jedoch müssen diese Ergebnisse der Ergocornin-EIAs als den Toxingehalt weit überschätzend und damit als unbrauchbar angesehen werden. Sehr stark kontaminierte Proben, vor allem solche mit Messergebnissen $> 10.000 \mu\text{g/kg}$, wurden grundsätzlich stark verdünnt und anschließend erneut enzymimmunchemisch untersucht. Der Einfluss unspezifischer Probenmatrixeinflüsse sollte dadurch minimiert werden.

Dem Testsystem für α -Ergocryptin kann mit einer Nachweisgrenze von 4,5 ng/ml und der Vermutung von Ergebnisbeeinflussung durch Kreuzreaktionen ebenfalls keine Praxistauglichkeit bestätigt werden. Hier spielt möglicherweise dieselbe Substanz als kreuzreagierender Störfaktor eine Rolle wie bei Ergocornin. In der großen Mehrzahl der Proben lagen die Messwerte des α -Ergocryptin EIAs weit über denjenigen der HPLC. Damit ist auch dieser Test für die Untersuchung von Futtergräsern derzeit als nicht praktikabel bzw. nicht aussagefähig anzusehen. Bezüglich der Testspezifität wurde festgestellt, dass die Antikörper gegen α -Ergocryptin bereits Strukturen innerhalb der Ergocryptine unterschieden (BMELV, 2007). Dabei zeigte die β -Form von Ergocryptin sowie die *inin*-Form des α - und β -Ergocryptins jeweils nur etwa 10 % Kreuzreaktivität im Vergleich zu α -Ergocryptin (Tab. 5). Kreuzreaktionen mit Ergocristin und Ergocornin stellten sich relativ deutlich dar, wohingegen die Kreuzreaktivität mit Ergotamin nur gering ausgeprägt war. Grundsätzlich wurden die *-inin*-Formen vieler Alkaloide von dem Test besser erkannt als die korrespondierenden *-in*-Formen. Aufgrund dessen sind erhebliche Kreuzreaktionen mit Ergotalkaloiden, für die keine Standards verfügbar waren, nicht zu erwarten (BMELV, 2007). Die ermittelten Wiederfindungsraten von künstlich mit Ergocornin kontaminierten Gräsern erfüllten die Erwartung an eine zuverlässige quantitative Analytik nicht. Die Wiederfindungsraten lagen bei beiden Gräsergattungen $> 200\%$.

Die Anwendbarkeit des „Generic Ergot Alkaloid“-EIA zur routinemäßigen Identifizierung und Quantifizierung von Ergotalkaloiden in Gräsern kann mit der vorliegenden Studie belegt werden. Das Verfahren ermöglicht auf einfache und schnelle Weise die Bestimmung des

Gesamtergotalkaloidgehalts in natürlich kontaminierten Gräsern. Durch die Anwendung dieses Testsystems wird berücksichtigt, dass kontaminiertes Probenmaterial stets eine Mischung mehrerer Ergotalkaloide enthält. Im Enzymimmuntest verhalten sich die Einzeltoxine hinsichtlich ihrer kompetitiven Eigenschaften additiv und können somit auch bei Einzelergebnissen unterhalb der individuellen Nachweisgrenze zu hohen positiven Analyseergebnissen führen. Der kompetitive direkte Enzymimmuntest erfasst die Summe der Ergotalkaloide in Gräsern in Konzentrationen von $\geq 40 \mu\text{g/kg}$. Dies ist bezüglich der toxikologischen Relevanz ausreichend. Die Wiederfindungsraten der Toxinstandardmischung wurden in Gräsern der Gattung *L. perenne* und *F. arundinacea* bei unterschiedlichem Kontaminationsniveau bestimmt. Die erzielten Ergebnisse (LP: 114,5 % bei 500 ng/g bzw. 99 % bei 1.000 ng/g; FA: 114,8 bei 500 ng/g bzw. 99 % bei 1.000 ng/g) bestätigen, dass das einfache Extraktionsverfahren für die zuverlässige, quantitative Analytik von Ergotalkaloiden geeignet ist. Die Probenextraktion in Acetonitril/phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit anschließender Filtration erwies sich als geeignet zum weiteren Einsatz im gruppenspezifischen EIA. Um störende Probenmatrixeffekte möglichst vollständig eliminieren zu können, war eine Verdünnung der Proben von 1:10 mit PBS pH 6,0 ausreichend. Für einzelne, insbesondere stark belastete Proben, ist eine höhere Verdünnung der Probenextrakte zu empfehlen.

Der Enzymimmuntest für Ergotamin zeigt für Gräser verschiedener Gattungen eine genügend hohe Sensitivität und Spezifität. Mit einer Nachweisgrenze von $20 \mu\text{g/kg}$ ist eine ausreichende Empfindlichkeit des Testsystems zur toxikologischen Analyse gegeben. Das gewählte Extraktionsverfahren erwies sich zur Elimination von Probenmatrixeffekten für Gräser als sinnvoll. Die Wiederfindungsraten von künstlich mit Ergotamin (500 ng/g) kontaminierten Proben betrugen für LP 146 %, für FA bei gleicher Toxinmenge 106 %. Folglich lassen sich falsch positive/negative Testergebnisse weitgehend ausschließen.

Die Testdauer der in dieser Arbeit angewendeten Enzymimmuntests liegt bei etwa 2,5 h. Die Verfahren eignen sich daher zum schnellen Einsatz in der Routinediagnostik von Gräsern. Für Screeninguntersuchungen wäre eine Reduktion der Replikate je Probe von vier auf zwei vorteilhaft. Damit könnten je Mikrotiterplatte bis zu 34 Grasproben untersucht werden.

5.2 Methodenvergleich EIA und HPLC für Ergotalkaloide

Für die Vergleichsuntersuchungen des „Generic Ergot Alkaloid“-EIA und der HPLC für natürlich kontaminierte Gräser der Gattung *F. arundinacea* und *L. perenne* lassen sich aufgrund der geringen Anzahl von Proben, die in den Vergleich einbezogen wurden, nur vorsichtige Aussagen ableiten. Desweiteren ist zu berücksichtigen, dass das HPLC-Verfahren ursprünglich zur Bestimmung von Ergotalkaloiden in Getreide, Getreideerzeugnissen und Brot entwickelt wurde.

Die Korrelation für *F. arundinacea* ($r^2=0,995$) weist einen deutlichen linearen Zusammenhang auf, allerdings wurden in der HPLC für diese Grasart durchweg höhere Ergebnisse erzielt als im EIA. Für *L. perenne*-Proben kann die Übereinstimmung der Ergebnisse ($r^2=0,529$) als gut bezeichnet werden. Auch für Gräser dieser Gattung wurde eine Tendenz zu höheren HPLC-Messwerten gegenüber den Ergebnissen des gruppenspezifischen Enzymimmuntests festgestellt. Die Übereinstimmung der Ergebnisse ist ausreichend für die Anwendung in der Screeningdiagnostik. Grundsätzlich sind sowohl höhere als auch niedrigere Messwerte im „Generic Ergot Alkaloid“-EIA gegenüber denen der HPLC möglich, weil für die einzelnen Alkaloide unterschiedliche Kreuzreaktionen bestehen. Bei Kreuzreaktionen <100 %, was für die meisten Alkaloide des gruppenspezifischen EIAs der Fall ist, ergeben die einzelnen Alkaloide im EIA niedrigere Werte als tatsächlich in der Probe vorhanden sind. Folglich ist auch die Summenbelastung geringer als die in der HPLC ermittelten. Der generische Ergotalkaloid-EIA ist zudem deutlich durch das Alkaloid Ergometrin geprägt. Ist der Anteil an Ergometrin in einer Probe hoch, so steigt auch der gemessene Alkaloidgesamtwert, wohingegen ein geringerer Anteil von Ergometrin in der Probe in niedrigeren Werten, als mittels HPLC ermittelt, resultiert.

5.3 Untersuchungen von Gräsern

5.3.1 Vorkommen von Ergotalkaloiden

Zur Identifizierung von mit Ergotalkaloiden belasteten Futtergräsern deutscher Wiesen und Weiden wurden in den Jahren 2007 und 2008 verschiedene Poaceen untersucht. Die Untersuchung berücksichtigte unterschiedliche Aspekte, so dass ein Überblick über die Gesamtbelastungssituation möglich wurde. Besonderes Interesse wurde auf Gräser gelegt, die häufig auf Weiden und im Futtertrog heimischer landwirtschaftlicher Nutztiere zu finden sind

und mutualistische Beziehungen mit Ergotalkaloid produzierenden Endophyten eingehen. Zusätzlich zu speziesspezifischen, regionalen und jahreszeitlichen Besonderheiten wurde auch die Toxinbelastung in den verschiedenen Pflanzenteilen berücksichtigt.

Bei der Auswahl des Probenmaterials wurde die Tatsache berücksichtigt, dass bei mehrfach blühenden Gräsern und mit zunehmender Länge der Blühdauer auch die Wahrscheinlichkeit eines Befalls mit Mutterkorn ansteigt. Obwohl es für die toxikologische Bewertung keinen Unterschied macht, ob ein Ergotalkaloid von *Claviceps spp.* oder *Neotyphodium spp.* stammt, sollte in dieser Arbeit auch der Frage nachgegangen werden, ob Endophyten bedingte Alkaloide in Deutschland eine Rolle spielen könnten. Hierzu sollte durch die Beprobung im Frühjahr ein Befall mit *Claviceps spp.* und relevante Mengen Mutterkorn möglichst ausgeschlossen werden.

Die Untersuchungen von Futtergräsern der Gattung *F. arundinacea* und *L. perenne* belegen, dass mit Ergotalkaloiden kontaminierte Pflanzen auf natürlichen Grünlandstandorten weit verbreitet und häufig zu finden sind. Von den insgesamt 50 untersuchten *F. arundinacea*-Proben waren im gruppenspezifischen Nachweis für Ergotalkaloide 62 % kontaminiert. Die Vorkommenshäufigkeit von belasteten *L. perenne*-Gräsern (n=47) war im gleichen Testsystem mit 87 % noch höher. Der Anteil von belasteten Rohrschwingelpflanzen im Ergotamin-EIA betrug 96 %, für das Deutsche Weidelgras wurde in 95 % der Pflanzen eine Toxinbelastung festgestellt. Die Versuchsergebnisse lassen eine Abstufung der Ergotalkaloidbelastung im „Generic Ergot Alkaloid“-EIA und im Ergotamin-EIA in absinkender Reihenfolge für *L. perenne* (Median: 500 µg/kg bzw. 200 µg/kg) > *F. arundinacea* (Median: 100 µg/kg bzw. 65 µg/kg) > sonstige *Poaceae* erkennen.

Die im „Generic-Ergot-Alkaloid“-EIA ermittelte höhere Alkaloidbelastung des Deutschen Weidelgrases gegenüber dem Rohrschwingel korreliert mit den eigenen Beobachtungen zu dem visuell erkennbaren Mutterkornbefall an der Pflanze. In Gräsern der Gattung *L. perenne* waren häufiger Sklerotien sichtbar als bei *F. arundinacea*-Gräsern. Insbesondere fiel dies an solchen Standorten auf, an denen sich bereits verblühte oder aufgrund länger einwirkender Sonneneinstrahlung vertrocknete *L. perenne*-Gräser befanden. Frisches Gras, das gerade erst Blüten ausgebildet hatte, zeigte sich in der Regel nicht mit Sklerotien befallen. Der Mutterkornbesatz von Sommergräsern der Vegetationsperiode I war zu Beginn der Probennahme (Juli 2008) geringer als von Gräsern, die im frühen Herbst des gleichen Jahres

gesammelt wurden. Die Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Wyss und Vogel (1997) überein, die einen steigenden Befallsgrad von Mutterkorn mit zunehmendem Alter des Grünfutters auf der Weide feststellten.

Die Untersuchungen von Blätterproben des Frühjahres ergaben im gruppenspezifischen EIA insgesamt niedrige Messwerte. Die Konzentrationsbereiche lagen bei 40–350 µg/kg für *F. arundinacea* und bei 40–200 µg/kg für *L. perenne*. Die Messergebnisse der Gesamtpflanze lagen im gleichen Testsystem bei *F. arundinacea*-Proben des Sommers im Konzentrationsbereich von 40–7.500 µg/kg und bei *L. perenne*-Proben bei 40–28.600 µg/kg. Auch wenn die Probenzahl für eine definitive Aussage zu gering ist, deuten diese Befunde doch erstmals darauf hin, dass neben Mutterkorn auch Endophyten eine bedeutsame Quelle für die Kontamination von Futtergräsern mit Ergotalkaloiden sind. Möglicherweise bilden die Endophyten zwar weniger Ergotalkaloide als *Claviceps*, dafür dürfte die Belastung häufiger vorkommen als ein Mutterkornbefall. Damit ist für Deutschland erstmals die Relevanz von Endophyten als Ergotalkaloidquelle identifiziert worden, ein Befund der für andere Länder bereits beschrieben worden ist (Miles et al., 1996; Shelby et al., 1998; Cagaš et al., 1999). In Anbetracht der Untersuchungsergebnisse sollten weitere Studien in Erwägung gezogen werden, bei denen die Faktoren Erntezeitpunkt und Toxizität, gegebenenfalls im Tierversuch, mit untersucht werden könnten.

Aussagen über die regionale Alkaloidbelastung von Futtergrasproben in Deutschland sind aufgrund der geringen gesammelten Probenanzahl von Gräsern außerhalb Nordrhein-Westfalens nicht möglich. Grundsätzlich soll aber auf den Einfluss regional bedingter Witterungsunterschiede hingewiesen werden. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass an den verschiedenen Standorten mit unterschiedlich hohem Infektionsdruck zu rechnen ist.

Der Anteil von *Poacea*-Proben, die nicht zu den wirtschaftlich bedeutendsten Futtergräsern in Deutschland zählen und im gruppenspezifischen Nachweis für Ergotalkaloide unterhalb der Nachweisgrenze lagen, betrug 71 %. Die erzielten Maxima im „Generic Ergot Alkaloid“-EIA waren mit 200 µg/kg für *D. glomerata* bzw. 300 µg/kg für *A. pratensis* sehr gering. Positiv getestete Proben waren bezogen auf den Median im Ergotamin-EIA ebenfalls nur im niedrigen Konzentrationsbereich belastet. Inwiefern Standort, klimatische Bedingungen und individuelle Anfälligkeit der Pflanze zu einer Beeinflussung der Ergebnisse geführt haben, ist aufgrund der eigenen Testergebnisse nicht zu beurteilen.

5.4 Ergotalkaloidbelastung und Endophyten

Bei allen Proben von *L. perenne* wurden in Vegetationsperiode II (Frühjahr 2008) im Testsystem des „Generic Ergot Alkaloid“-EIA geringere Alkaloidbelastungen ermittelt als in solchen der Vegetationsperiode I (Sommer 2007). Die Mediane für *L. perenne* differierten im saisonalen Vergleich deutlich voneinander (VP I: 3.500 µg/kg; VP II: 70 µg/kg). Ähnliche Untersuchungsergebnisse wurden für *F. arundinacea* im gleichen Testsystem erzielt. Höhere Ergotalkaloidkonzentrationen gingen in dieser Arbeit grundsätzlich mit dem Vorhandensein von Sklerotien einher, die bei der Zerkleinerung des Grases mit in das Untersuchungsmaterial gelangten.

Da Mutterkörner in Grasproben des Frühjahres 2008 nicht vorhanden waren, liegt nahe, die insgesamt niedrigen Ergotalkaloidkonzentrationen des Frühjahres mit dem Vorkommen von Endophyten zu erklären. Zur Absicherung der Vermutung würde sich die Bestimmung von Ergovalin oder Lolitrem B eignen, die beide bereits in mit *Neotyphodium spp.* infizierten *L. perenne*-Gräsern entdeckt worden sind (Cagaš et al., 1999; Oldenburg, 1997). Ergovalin ist als Toxinstandard nicht verfügbar und somit auch in der HPLC nicht als Ergotalkaloid identifizierbar. Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen Ergovalin und Ergocornin, sowie geschätzte Kreuzreaktivitäten zwischen dem Testsystem für Ergocornin und Ergovalin (> 1%) bzw. Ergovalinin (>3,3%) (BMELV, 2007) verstärken die Notwendigkeit weitergehender Untersuchungen.

5.5 Schlussfolgerungen

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen zeigten, dass Ergotalkaloide in Gräsern relativ häufig und teilweise in recht hohen Konzentrationen vorkommen können. Hierbei ist neben dem parasitären Befall mit *Claviceps spp.* auch eine Alkaloidbildung durch Endophyten zu berücksichtigen. Wenn auch die Höhe des Alkaloideintrags in die Futtermittel Gras bzw. Heu derzeit kaum realistisch abschätzbar ist, kann doch eine regelmäßige Ergotalkaloid-Exposition von landwirtschaftlichen Nutztieren durch Futtergräser abgeleitet werden. Dies sollte sowohl im Hinblick auf die Tiergesundheit als auch im Hinblick auf ein nicht auszuschließendes carry-over von Alkaloiden oder ihren Metaboliten in die Milch von lebensmittelliefernden Tieren weiter untersucht werden. Die in dieser Arbeit eingesetzten

Enzymimmuntests, insbesondere das gruppenspezifische Nachweissystem für Ergotalkaloide, könnten hierbei ein wertvolles analytisches Werkzeug darstellen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Anwendung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Ergotalkaloiden in Futtergräsern sowie dem Vorkommen dieser Toxine in Gräsern der Familie *Poaceae* auf deutschen Wiesen und Weiden. Insgesamt wurden 104 Grasproben aus zwei Vegetationsperioden der Jahre 2007 und 2008 untersucht.

Zur Bestimmung der Toxingehalte wurden auf der Verwendung von Antikörpern gegen Ergometrin, Ergotamin, α -Ergocryptin und Ergocornin basierende kompetitive Enzymimmuntests angewendet. Während drei Enzymimmuntests eine Teilspezifität für einzelne Ergotalkaloide (Ergotamin, α -Ergocryptin und Ergocornin) besitzen, ermittelt der „Generic Ergot Alkaloid“-Enzymimmuntest die Summenbelastung dieser Toxine in den Probenmaterialien. Die entsprechenden Nachweisgrenzen lagen bei 0,4 ng/ml (Toxinmischung), 0,2 ng/ml (Ergotamin), 4,5 ng/ml (α -Ergocryptin) und 17 ng/ml (Ergocornin).

In Ergänzung dazu wurden einige Ergotalkaloid-positive Proben zusätzlich mittels einer hochleistungsflüssigkeitschromatographischen Methode (HPLC) untersucht, mit der ein Nachweis von 14 Ergotalkaloiden (Ergometrin, Ergotamin, Ergocristin, α -Ergocryptin, β -Ergocryptin, Ergocornin, Ergosin und deren korrespondierende *-inin*-Isomere) gelang. Die Grasproben konnten in den EIAs und der HPLC nach Extraktion mittels eines Acetonitril/PBS pH 6,0-Gemisches (60/40; v/v) untersucht werden.

Die Nachweisgrenzen in den Gräsern lagen bei dem gruppenspezifischen EIA für Ergotalkaloide bei 40 μ g/kg bzw. bei 20 μ g/kg im Ergotamin-EIA, 450 μ g/kg im α -Ergocryptin-EIA und bei 1.700 μ g/kg im Ergocornin-EIA. Bei der Ermittlung der Wiederfindungsraten in künstlich kontaminierten Probenmaterialien wurden für den gruppenspezifischen immunchemischen Nachweis für Ergotalkaloide Ergebnisse von 86–133 % erzielt.

Ergotalkaloidpositive Gräser wurden in allen beprobten geografischen Regionen ermittelt. Insgesamt zeigten Gräser der Gattung *L. perenne*, mit Ausnahme des Testsystems für α -Ergocryptin, in allen weiteren Enzymimmuntests eine höhere Ergotalkaloidbelastung von Sommergräsern gegenüber Gräsern des Frühjahres. Die Ergotalkaloidbelastung bei

Sommergräsern der Gattung *F. arundinacea* war im „Generic Ergot Alkaloid“-EIA höher als die Alkaloidkontamination von Gräsern des Frühjahres. Die Testsysteme des α -Ergocryptin-EIA und Ergocornin-EIA erwiesen sich aufgrund starker Überschätzung des Ergotalkaloid-Gehalts als nicht praxistauglich. Im gruppenspezifischen Nachweis für Ergotalkaloide betrug der Anteil positiver *F. arundinacea*-Proben 62 %, für Gräser der Gattung *L. perenne* 87 %. Die gemessenen Konzentrationen lagen zwischen 40 $\mu\text{g/kg}$ und 7.500 $\mu\text{g/kg}$ (FA) sowie zwischen 40 $\mu\text{g/kg}$ und 28.600 $\mu\text{g/kg}$ (LP). Die Medianwerte betrugen 100 $\mu\text{g/kg}$ (FA) bzw. 500 $\mu\text{g/kg}$ (LP). Der Anteil positiver Testergebnisse im Ergotamin-EIA betrug für *F. arundinacea* 96 % und für *L. perenne* 95 %. Der Median lag bei 65 $\mu\text{g/kg}$ für *F. arundinacea* und bei 200 $\mu\text{g/kg}$ für *L. perenne*. Ergotalkaloide wurden auch in anderen der Familie der *Poacea* angehörigen Spezies festgestellt, zumeist jedoch in niedrigeren Konzentrationen.

Mit den durchgeführten Vergleichsuntersuchungen anhand natürlich kontaminierter Gräserproben wurden für Gräser der Gattung *F. arundinacea* und *L. perenne* brauchbare Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen der EIA-Methoden und der HPLC-Methode festgestellt (FA: $r^2=0,995$; LP: $r^2=0,529$).

Die Eignung des „Generic Ergot Alkaloid“-Enzymimmuntests zum Nachweis von Ergotalkaloiden in Gräsern und die des enzymimmunologischen Testsystems für Ergotamin zum selektiven Nachweis dieses Alkaloids konnten mit vorliegender Arbeit bestätigt werden.

SUMMARY

A study on the occurrence of ergot alkaloids in forage grasses

This study is concerned with the application of enzyme immunoassays (EIAs) to detect ergot alkaloids in forage grasses, and also with the prevalence of these toxins in the plant family *Poaceae* in meadows and pastures in Germany. A total of 104 grass samples from two vegetation periods (2007 and 2008) were analysed.

Competitive enzyme immunoassays based on antibodies to ergonovine, ergotamine, α -ergocryptine and ergocornine were applied in order to identify the level of toxins (mycotoxins). While three EIA systems have partial specificity for particular ergot alkaloids (ergotamine, α -ergocryptine and ergocornine), the “Generic Ergot Alkaloid“-EIA, as a group-specific indicator of ergot alkaloids, can be used for the simultaneous detection of toxins in the samples taken. The corresponding detection limits were 0.4 ng/ml (toxin mixture), 0.2 ng/ml (ergotamine), 4.5 ng/ml (α -ergocryptine) and 17 ng/ml (ergocornine).

Additionally, several ergot alkaloid positive samples were analysed using High Pressure Liquid Chromatography (HPLC), by which it was possible to detect fourteen ergot alkaloids (ergonovine, ergotamine, ergocristine, α -ergocryptine, β -ergocryptine, ergocornine, ergosine and their corresponding *-inine*-isomers). After extraction in acetonitrile/PBS mixture (60/40; v/v), the grass samples were analysed by means of EIAs and HPLC.

The detection limit for grass samples was 40 $\mu\text{g/kg}$ using group-specific EIA for ergot alkaloids. Using ergotamine-EIA, the detection limit was 20 $\mu\text{g/kg}$, using α -ergocryptine-EIA it was 450 $\mu\text{g/kg}$, and using ergocornine-EIA it was 1700 $\mu\text{g/kg}$. After examining spiked grass samples, the recovery rates ranged from 86 % to 133 % when applying the group-specific immunochemical detection method for ergot alkaloids.

In all geographical regions sampled, positive ergot alkaloid samples were detected. Overall, in all testing systems (with the exception of the testing system for α -ergocryptine), the contamination with ergot alkaloids was higher in summer grasses than in spring grasses of the species *L. perenne* (perennial rye-grass). In the “Generic Ergot Alkaloid“-EIA the contamination rate of summer grasses of the species *F. arundinacea* was higher than that of

spring grasses. The valuation of suitability for the testing systems of the α -ergocryptine-EIA and the ergoconine-EIA was negative.

With the group-specific detection method for ergot alkaloids, the percentage of contaminated samples of *F. arundinacea* was 62 % and for grasses of the species *L. perenne* 87 %. Sample concentration ranged from 40 $\mu\text{g/kg}$ to 7500 $\mu\text{g/kg}$ (FA) and from 40 $\mu\text{g/kg}$ to 28600 $\mu\text{g/kg}$ (LP). The median was 100 $\mu\text{g/kg}$ (FA) and 500 $\mu\text{g/kg}$ (LP) respectively. Forage grasses were frequently contaminated with ergotamine (FA: 96 %, LP: 95 %). The median of the concentration of ergotamine was 65 $\mu\text{g/kg}$ for *F. arundinacea* and 200 $\mu\text{g/kg}$ for *L. perenne*. Ergot alkaloids were also detected in other species of the *Poaceae* family, although only in lower concentrations.

The comparative analysis of naturally contaminated grass samples indicated that the results of the “Generic Ergot Alkaloid“-EIA-method strongly correlated with those of the HPLC-method when applied to the genus *F. arundinacea* and *L. perenne* (FA: $r^2=0.995$; LP: $r^2=0.529$).

The present study succeeded in confirming the suitability of the “Generic Ergot Alkaloid“-EIA-method for the detection of ergot alkaloids in grasses and of the enzyme immunological test system for ergotamine for the detection of this alkaloid.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Aellig, W. H. und E. Nüesch (1977):

Comparative pharmacokinetic investigations with tritium-labeled ergot alkaloids after oral and intravenous administration in man. *Int. J. Clin. Pharmacol.* 15: 106–112.

Aichele, D. und H.-W. Schwegler (1998):

Unsere Gräser. Kosmos Verlag, 11. Auflage.

Alexopoulos, C. J. (1966):

Einführung in die Mykologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Bacon, C. W. (1993):

Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte-infected tall fescue. *Agric., Ecosyst. and Envir.* 44: 123–141.

Bacon, C. W., P. C. Lyons, J. K. Porter und J. D. Robbins (1986):

Ergot toxicity from endophyte-infected grasses: a review. *Agron. J.* 78: 106–116.

Bacon, C. W., J. K. Porter, J. D. Robbins und E. S. Luttrell (1977):

Epichloë typhina from toxic tall fescue grasses. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 576–581.

Bacon, C. W. und M. R. Siegel (1988):

Endophyte parasitism of tall fescue. *J. Prod. Agric.* 1: 45–55.

Baldioli, M. (1995):

Einjähriges Weidelgras (*Lolium multiflorum westerwoldicum*) = Westerwoldisches Weidelgras. Internetdokument: www.agrinf.agrar.tu-muenchen.de.

Barlier, A. und P. Jaquet (2006):

Quinagolide-a valuable treatment option for hyperprolactinaemia. *Eur. J. Endocrinol.* 154: 187–195.

Barnikol, H., S. Gruber, A. Thalmann und H. L. Schmidt (1982):

Mutterkornvergiftung beim Schwein. *Tierärztl. Umschau* 37: 324–332.

Barnikol, H. und A. Thalmann (1986):

Neuerliche Ausbreitung von Mutterkorn, eine Gefahr für Mensch und Tier ? *Tierärztl. Umschau* 41: 178–185.

Biermasz, N. R., J. A. Romijn, A. M. Pereira und F. Roelfsema (2005):

Current pharmacotherapy for acromegaly: a review. *Expert. Opin. Pharmacother* 6: 2393–2405.

Bös, B. (2000):

Das GIFTPFLANZEN.COMpendium. Internetdokument: www.giftpflanzen.com.

Botha, C. J., T. W. Naudé, M. L. Moroe und G. E. Rottinghaus (2004):

Gangrenous ergotism in cattle grazing fescue (*Festuca elatior* L.) in South Africa. *J. South*

Afric. Vet. Assoc. 75: 45–48.

Browning, R. (2004):

Effects of endophyte-infected tall fescue on indicators of thermal status and growth in Hereford and Senepol steers. J. Anim. Sci. 82: 634–643.

Browning, R. und M.L. Leite-Browning (1997):

Effect of ergotamine and ergonovine on thermal regulation and cardiovascular function in cattle. J. Animal Sci. 75: 176–181.

Buchta, M. und L. Cvak (1999):

Ergot alkaloids and other metabolites of the genus *Claviceps*. In: Ergot: the genus *Claviceps* 6: 173–200.

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) (2007):

Forschungsprojekt 03HS019 „Immunchemische Nachweisverfahren für Mutterkornalkaloide“. Abschlussbericht. Ausgeführt von der Professur für Milchwissenschaften, Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen, Prof. Dr. E. Usleber.

Bundessortenamt (1999):

Beschreibende Sortenliste 1999 - Gräser, Klee, Luzerne. Landbuch-Verlag, Hannover.

Bush, L. P., P. L. Cornelius, R. C. Buckner, D. R. Varney, R. A. Chapman, P. B. Burrus II., C. W. Kennedy, T. A. Jones und M. J. Saunders (1982):

Association of N-acetylloin and N-formylloin with *Epicloë typhina* in tall fescue. Crop. Sci. 22: 941–943.

Bush, L. P. und D. Schmidt (1994):

Alkaloid content of meadow fescue and tall fescue with their natural endophytes. Bulletin of the International Conference on Harmful and Beneficial Mikroorganisms in Grassland, Pasture and Turf. Paderborn, 1993. IOBC/WPRS Bulletin 17: 259–265.

Cagaš, B. (2000):

The endophytes *Neotyphodium* spp., their incidence in the Czech republic, problems, questions, work with E+ plants. COST 828 „Endophyte Meeting“. Institut für Acker und Pflanzenbau Halle, Germany.

Cagaš, B., M. Flieger und J. Olšovská (1999):

Concentration of ergot alkaloids in Czech ecotypes of *Lolium perenne* and *Festuca pratensis*. Grass and Forage Sci. 54: 365–370.

Cheeke, P. R. (1995):

Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock. J. Anim. Sci. 73: 909–918.

Chong, Y. S., L. L. Su und S. Arulkumaran (2004):

Current strategies for the prevention of postpartum haemorrhage in the third stage of labour. Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 16: 143–150.

Clay, K. (1987):

Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. *Oecologia* 73: 358–362.

Clay, K. (1988):

Clavicipitaceous fungal endophytes of grasses: Coevolution and the change from parasitism to mutualism. In: Hawksworth, D. L. und K.A. Pirozynski (Hrsg.): Coevolution of fungi with plants and animals. Academic Press, New York: 79–105.

Clay, K. (1991):

Fungal endophytes, grasses and herbivores. Mikrobiobal mediation of plant-herbivore interaction. In: Barbosa, P., V. A. Krishchik und C. G. Jones (Hrsg.): Microbial mediation of plant-herbivore interactions. John Wiley and Sons, Inc. 19–226.

Clay, K. (1998):

Fungal endophyte infection and the population dynamics of grasses. In: Cheplick, G. P. (Hrsg.): Population biology of grasses. Cambridge University Press. 255–285.

Clay, K. und C.L. Schardl (2002):

Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist* 160: 99–127.

Conert, H. J. (1998):

Spermatophyta: Angiospermae: Monocotyledones 1 (2), Poaceae (Echte Gräser oder Süßgräser), 3. Auflage. In: Conert, H. J., E. J. Jäger, J. W. Kadereit, W. Schultze-Motel, G. Wagenitz und H. E. Weber (Hrsg.): Gustav Hegi-Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Band I, Teil 3. Parey Buchverlag, Berlin.

Cross, D. L., L. M. Redmond und J. R. Strickland (1995):

Equine fescue toxicosis: signs and solutions. *J. Anim. Sci.* 73: 899–908.

Dahme, E. und E. Weiss (1999):

Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. 5. Auflage. Enke Verlag, Stuttgart.

De Costa, C. (2002):

St Anthony's fire and living ligatures: a short history of ergometrine. *The Lancet* 359: 1768–1770.

De Lorme, M. J. M., S. L. Lodge-Ivey und A. M. Craig (2007):

Physiological and digestive effects of *Neotyphodium coenophialum*-infected tall fescue fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 85: 1199–1206.

Digneau, M. A., H. B. Schiefer und R. Blair (1986):

Effects of feeding ergot-contaminated grain to pregnant and nursing sows. *J. Vet. Med. A* 33: 757–766.

Di Menna, M. E., P. H. Mortimer, R. A. Prestidge, A. D. Hawkes und J. M. Sprosen (1992):

Lolitrems B concentrations, counts of *Acremonium lolii* hyphae, and the incidence of ryegrass

staggers in lambs on plots of *A.lolii*-infected perennial ryegrass. NZ. J. Agric. Res. 35: 211–217.

Eadie, M. J. (2003):

Convulsive ergotism: epidemics of the serotonin syndrome. The Lancet Neurol. 2: 429–434.

Easton, S. und B. Tapper (2005):

Neotyphodium research and application in New Zealand. In: Roberts, C. A., C. P. West und D. E. Spiers (Hrsg.): *Neotyphodium* in cool-season grasses. Blackwell Publishing, USA, 35–42.

Eckert, H., F. R. Kiechel, J. Rosenthaler, R. Schmidt und E. Schreier (1978):

Biopharmaceutical aspects. In: Berde, B. und H. O. Schild (Hrsg.): Ergot alkaloids and related compounds. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 719–796.

Eggestein, S. (1997):

Untersuchungen zum Vorkommen von Endophyten der Gattung *Acremonium* in *Festuca*-Arten Europas sowie zu Symbioseeffekten bei *Festuca pratensis*. Diss., Martin-Luther-Universität, Halle.

Engvall, E. und P. Pearlman (1971):

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochem. 8: 871–874.

European Food Safety Authority (EFSA) (2005):

Opinion of the Scientific Panel on ergot as undesirable substance in animal feed. The EFSA Journal 225: 1–27.

European Medicines Agency (EMA) (1999):

Ergometrine Maleate. Internetdokument: www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/023797en.pdf.

Fayrer-Hosken, R., G. Heusner, N. Hill und A. Caudle (2008):

Review on effects of fescue grass ergot alkaloids in the horse and preliminary study on effect of fescue grass ergot alkaloid in the stallion. J. Equine Vet. Sci. 28: 666–670.

Fioravanti, M. und L. Flicker (2001):

Efficacy of nicergoline in dementia and other age associated forms of cognitive impairment. Cochrane. Database. Syst. Rev. CD003159

Fletcher, L. R., I. Garthwaite und N. R. Towers (1993):

Ryegrass staggers in the absence of lolitrem B. In: Proceedings of the Second International Symposium on *Acremonium*/grass interactions, Palmerston North, New Zealand, 119–121.

Fletcher, L. R. und I. C. Harvey (1981):

An association of a *Lolium* endophyte with ryegrass staggers. NZ.Vet. J. 29: 185–186.

Flieger, M., M. Wurst und R. Shelby (1997):

Ergot alkaloids-sources, structures and analytical methods. Folia Microbiol. 42: 3–30.

Forth, W., D. Henschler, W. Rummel und K. Starke (2001):

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage, Wissenschaftsverlag Mannheim-Leipzig-Wien-Zürich.

Galey, F. D., M. L. Tracey, A. L. Craigmill, B. C. Barr, G. Markegard, R. Peterson und M. O'Connor (1991):

Staggers induced by consumption of perennial ryegrass in cattle and sheep from northern California. J. Am. Vet. Med. Assoc. 199: 466–470.

Glenn, A. E., C. W. Bacon, R. Price und R. T. Hanlin (1996):

Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. Mycologia 88: 369–383.

Goadsby, P. J. (2003):

Migraine: diagnosis and management. Intern. Med. J. 33: 436–442.

Grünau, B., I. Nolte und H. O. Hoppen (1996):

The treatment of pseudopregnancy in the bitch with prolactin inhibitors metergoline and bromocriptine. Tierärztl. Praxis 24: 149–155.

Guggisberg, H. (1954):

Mutterkorn - vom Gift zum Heilstoff. Karger Verlag, Basel, New York.

Haarmann, T., I. Ortel, P. Tudzynski und U. Keller (2006):

Identification of the cytochrome P450 monooxygenase that bridges the clavine and ergoline alkaloid pathways. ChemBioChem 7: 645–652.

Happe, S. und C. Trenkwalder (2004):

Role of dopamine receptor agonists in the treatment of restless legs syndrome. CNS Drugs 18: 27–36.

Hesse, U., W. Schöberlein und K. Förster (1999):

Sammlungsmaterial von *Lolium perenne* und *Festuca*-Arten zur Erstellung von endophythaligen und -freien Pflanzen des gleichen Genotypes. 41. Fachtagung des DLG-Ausschusses „Gräser, Klee und Zwischenfrüchte“ am 30.1.1999 in Fulda, 89–93.

Hesse, U., W. Schöberlein, K. Förster und W. Diepenbrock (2000):

Einfluss der Endophyten *Neotyphodium lolii* auf den Samenertrag von *Lolium-perenne*-Genotypen. Bericht über die 51. Arbeitstagung der Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter, 135–138.

Hill, N. S. (2005):

Absorption of ergot alkaloids in the ruminant. In: Roberts, C. A., C. P. West und D. E. Spiers (Hrsg.): *Neotyphodium* in cool-season grasses, Blackwell Publishing, USA, 271–290.

Hill, N. S., G. E. Rottinghaus, C. S. Agee und L. M. Schultz (1993):

Simplified sample preparation for HPLC analysis of ergovaline in tall fescue. Crop. Sci. 33: 331–333.

Hofmann, A. (1964):

Die Mutterkornalkaloide. Vom Mutterkorn zum LSD. Die Chemie der Mutterkornalkaloide. Reprint der Originalausgabe, 2. Aufl. 2006, Nachschatten Verlag, Soloturn.

Hofmann, A. (1978):

Historical view on ergot alkaloids. *Pharmacology* 16: 1–11.

Hoveland, C. S. (1993):

Importance and economic significance of the *Acremonium* endophytes to performance of animals and grass plants. *Agric., Ecosyst. and Envir.* 44: 3–12.

Hoveland, C. S., S. P. Schmidt, C. C. King jr., J. W. Odom, E. M. Clark, J. A. McGuire, L. A. Smith, H. W. Grimes und J. L. Holliman (1983):

Steer performance and association of *Acremonium coenophialum* fungal endophyte on tall fescue pasture. *Agron. J.* 75: 821–824.

Hubbard, C.E. (1985):

Gräser-Beschreibung, Verbreitung, Verwendung. 2. Auflage, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.

Ibraheem, J. J., L. Paalzow und P. Tfelt-Hansen (1983):

Low bioavailability of ergotamine tartrate after oral and rectal administration in migraine sufferers. *Br. J. Clin. Pharmac.* 16: 695–699.

Jauhar, P. P. (1993):

Cytogenetics of the *Festuca-Lolium* complex: relevance to breeding. Monographs on Theor. Appl. Gen. 18, Springer Verlag, Berlin.

Kobel, H. und J.J. Sanglier (1986):

Ergot alkaloids. In: *Biotechnology*, 4: 569–609, VCH Weinheim.

Kromidas, S. (1999):

Validierung in der Analytik. In: Gruber, U. und W. Klein (Hrsg.): *Die Praxis der instrumentellen Analytik*. Verlag Wiley-VCH, Weinheim, New York.

Lacefield, G. D., J. C. Henning und T. D. Phillips (2003):

Tall Fescue. Cooperative Extension Service, University of Kentucky-College of Agriculture. *AGR*: 59, 1–4.

Latch, G. C. M. (1993):

Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. *Agric., Ecosyst. and Envir.* 44: 143–156.

Latch, G. C. M. und M. J. Christensen (1982):

Ryegrass endophyte, incidence, and control. *NZ. J. Agric. Res.* 25: 443–448.

Latch, G. C. M., W. F. Hunt und D. R. Musgrave (1985):

Endophytic fungi affect growth of perennial ryegrass. *NZ. J. Agric. Res.* 28: 165–168.

Lewis, G. C., C. Ravel, W. Naffaa, C. Astier und G. Charmet (1997):

Occurrence of *Acremonium* endophytes in wild populations of *Lolium* spp. in European countries and a relationship between level of infection and climate in France. *Ann. Appl. Biol.* 130: 227–238.

Loken, T. (1984):

Ergot from meadow grass in Norway: chemical composition and toxicological effects in sheep. *Nord. Vet. Med.* 36: 259–265.

Lyons, P. C., R. D. Plattner und C. W. Bacon (1986):

Occurrence of peptide and clavine ergot alkaloids in tall fescue grass. *Science* 232: 487–489.

Märtlbauer, E., R. Dietrich und G. Terplan (1991):

Erfahrungen bei der Anwendung von Immunoassays zum Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln. *Arch. Lebensmittelhyg.* 42: 3–6.

Mainka, S., S. Dänicke, H. Böhme, K.-H. Ueberschär und F. Liebert (2007):

On the composition of ergot, and the effects of feeding two different ergot sources on piglets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 139: 53–68.

Mantegani, S., E. Brambilla und M. Varasi (1999):

Ergoline derivatives: receptor affinity and selectivity. *Il Farmaco* 54: 288–296.

McLeay, L. M., B. L. Smith und G. W. Reynolds (2002):

Cardiovascular, respiratory, and body temperature responses of sheep to the ergopeptides ergotamine and ergovaline. *Am. J. Vet. Res.* 63: 387–393.

McMurray, R. W. (2001):

Bromocriptine in rheumatic and autoimmune diseases. *Semin. Arthritis Rheum.* 31: 21–32.

Mielke, H. (2000):

Studien über den Pilz *Claviceps purpurea* [Fries] Tulasne unter Berücksichtigung der Anfälligkeit verschiedener Roggensorten und der Bekämpfungsmöglichkeiten des Erregers. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem.

Miles, C. O., M. E. di Menna, S. W. L. Jacobs, I. Garthwaite, G. A. Lane, R. A. Prestidge, S. L. Marshall, H. H. Wilkinson, C. L. Schardl, O. J.-P. Ball und G. C. M. Latch (1997):

Endophytic fungi in indigenous australasian grasses associated with toxicity to livestock. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 601–606.

Miles, C. O., G. A. Lane, M. E. di Menna, I. Garthwaite, E. L. Piper, O. J.-P. Ball, G. C.M. Latch, J. M. Allen, M. B. Hunt, L. P. Bush, F. K. Min, I. Fletcher und P. S. Harris (1996):

High levels of ergonovine and lysergic acid amide in toxic *Achnatherum inebrians* accompany infection by an *Acremonium*-like endophytic fungus. *J. Agric. Food Chem.* 44: 1285–1290.

Miyazaki, S., M. Fukumura, M. Yoshioka und N. Yamanaka (2001):

Detection of endophyte toxins in the imported perennial ryegrass straw. J. Vet. Med. Sci. 63: 1013–1015.

Molloy, J. B., C. J. Moore, A. G. Bruyeres, S. A. Murray und B. J. Blaney (2003):

Determination of dihydroergosine in sorghum ergot using an immunoassay. J. Agric. Food Chem. 51: 3916–3919.

Monroe, J. L., D. L. Cross, L. W. Hudson, D. M. Hendricks, S. W. Kennedy und W. C. Bridges jr. (1988):

Effects of selenium and endophyte-contaminated fescue on performance and reproduction in mares. J. Equine Vet. Sci. 8: 148–153.

Morgan-Jones, G. und W. Gams (1982):

Notes on hyphomycetes. XLI. An endophyte of *Festuca arundinacea* and the anamorph of *Epichloë typhina*, new taxa in one of two new sections of *Acremonium*. Mycotaxon 15: 311–318.

Moser, L. E. und C. S. Hoveland (1996):

Cool-season grass overview. In: Moser, L. E. et al. (Hrsg.): Cool-season forage grasses, 1–14.

Moubarak, A. S., E. L. Piper, C. P. West und Z. B. Johnson (1993):

Interaction of purified ergovaline from endophyte-infected tall fescue with synaptosomal ATPase enzyme system. J. Agric. Food Chem. 41: 407–409.

Moubarak, A. S. und C. F. Rosenkrans jr. (2000):

Hepatic metabolism of ergot alkaloids in beef cattle by cytochrome P450. Biochem. and Biophys. Res. Commun. 274: 746–749.

Moubarak, A. S., C. F. Rosenkrans jr. und Z. B. Johnson (2002):

The involvement of Cytochrome P450 in ergot alkaloid metabolism. Arkansas Anim. Sci. Department Report, 58–60.

Mühle, E. und K. Breuel (1977):

Das Mutterkorn. 2. Auflage. Ziemsen Verlag, Wittenberg.

Neubauer, H. (1902):

Ueber die von A. Vogl entdeckte Pilzschicht in Loliumfrüchten. Zentralblatt Bakteriologie 9: 652–653.

Nimmerfall, F. und J. Rosenthaler (1976):

Ergot alkaloids: Hepatic distribution and estimation of absorption by measurement of total radioactivity in bile and urine. J. Pharmacokin. and Biopharm. 4: 57–66.

Novartis Pharma (2002):

Methergin. Fachinformation der Novartis Pharma GmbH.

Oldenburg, E. (1994):

Occurrence of fungal endophytes in *Lolium perenne*. Bulletin of the International Conference on Harmful and Beneficial Microorganisms in Grassland, Pasture and Turf. 17: 99–104.

Oldenburg, E. (1997):

Endophytic fungi and alkaloid production in perennial ryegrass in Germany. Grass and Forage Sci. 52: 425–431.

Oresanya, T. F., J. F. Patience, R. T. Zijistra, A. D. Beaulieu, D. M. Middleton, B. R. Blakley und D. A. Gillis (2003):

Defining the tolerable level of ergot in the diet of weaned pigs. Can. J. Anim. Sci. 83: 493–500.

Paterson, J., C. Forcherio, B. Larson, M. Samford und M. Kerley (1995):

The effects of fescue toxicosis on beef cattle productivity. J. Anim. Sci. 73: 889–898.

Perellino, N. C., J. Malyszko, M. Ballabio, B. Gioia und A. Minghetti (1993):

Identification of ergobine, a new peptide ergot alkaloid. J. Nat. Prod. 56: 489–493.

Petrini, O. (1991):

Fungal endophytes of tree leaves. In: J. A. Andrews und S. S. Hirano (Hrsg.): Microbial Ecology of leaves. Springer-Verlag, New York, 179–197.

Peyronneau, M. A., M. Delaforge, R. Riviere, J. P. Renaud und D. Mansuy (1994):

High affinity of ergopeptides for cytochromes *P*450 3A. Importance of their peptide moiety for *P*450 recognition and hydroxylation of bromocriptine. Eur. J. Biochem. 223: 947–956.

Prošek, M., E. Kučan, M. Katić und M. Bano (1976):

Quantitative fluorodensitometric determination of ergot alkaloids. Chromatographia 9: 273–276.

Prošek, M., E. Kučan, M. Katić und M. Bano (1977):

Quantitative fluorodensitometric determination of ergot alkaloids III. The total assay of the alkaloids. Chromatographia 10: 147–150.

Ravel, C., G. Charmet und F. Balfourier (1995):

Influence of the fungal endophyte *Acremonium lolii* on agronomic traits of perennial ryegrass in France. Grass and Forage Sci. 50: 75–80.

Realini, C. E., S. K. Duckett, N. S. Hill, C. S. Hoveland, B. G. Lyon, J. R. Sackmann und M. H. Gillis (2005):

Effect of endophyte type on carcass traits, meat quality, and fatty acid composition of beef cattle grazing tall fescue. J. Anim. Sci. 83: 430–439.

Redlin, S. C. und L. M. Carris (1997):

Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology, and evolution. 2. Aufl., APS Press, Minnesota.

Reed, K. F. M., A. Leonforte, P. J. Cunningham, J. R. Walsh, D. I. Allen, G. R. Johnstone und G. Kearney (2000):

Incidence of ryegrass endophyte (*Neotyphodium lolii*) and diversity of associated alkaloid concentrations among naturalised populations of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Aust. J. Agric. Res. 51: 569–578.

Reed, K. F. M., C. J. Scrivener, K. A. Rainsford und L. V. Walker (2005):

Neotyphodium research and application in Australia. In: Roberts, C. A., West, C. P. und D. E. Spiers (Hrsg.): *Neotyphodium* in cool-season grasses. Blackwell Publishing, USA, 43–54.

Reinholz, J. (2000):

Analytische Untersuchungen zu den Alkaloiden Lolitrem B und Paxillin von *Neotyphodium lolii* und *Lolium perenne*, in vivo und in vitro. Diss. Universität Paderborn. Internetdokument: ubdata.uni-paderborn.de/ediss/13/2000/reinholz/index.htm.

Richter, W. I. F., G. Röhrmoser, S. Komusinski und J. Wolff (1989):

Einsatz von mutterkornhaltigem Weizen in der Futterration von Ferkeln. VDLUFA-Schriftenreihe, Kongressband 30: 427–432.

Riederer, B., M. Han und U. Keller (1996):

D-lysergyl peptide synthetase from the ergot fungus *Claviceps purpurea*. J. Biol. Chem. 271: 27524–27530.

Riet-Correa, F., M. C. Méndez, A. L. Schild, P. N. Bergamo und W. N. Flores (1988):

Agalactica, reproductive problems and neonatal mortality in horses associated with the ingestion of *Claviceps purpurea*. Aust. Vet. J. 65: 192–193.

Rolle, M. und A. Mayr (2002):

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7. Auflage. Enke Verlag, Stuttgart.

Roth, L., H. Frank und K. Kormann (1990):

Giftpilze-Pilzgifte. Nikol Verlagsgesellschaft, Hamburg.

Rotter, R. G., R. R. Marquardt und J. C. Young (1985):

The ability of growing chicks to recover from short-term exposure to dietary wheat ergot and the effect of chemical and physical treatments on ergot toxicity. Can. J. Anim. Sci. 65: 975–983.

Rowan, D. D. (1993):

Lolitrem, peramine and paxilline: mycotoxins of the ryegrass/endophyte interaction. Agric. Ecosyst. and Envir. 44: 103–122.

Rowan, D. D., J. J. Dymock und M. A. Brimble (1990):

Effect of fungal metabolite peramine and analogs on feeding and development of argentine stem weevil (*Listronotus bonariensis*). J. Chem. Ecol. 16, abstract.

Saameli, K. (1978):

Effects in the uterus. In: Berde, B. und H. O. Schild (Hrsg.): Ergot alkaloids and related compounds. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 233–320.

Saha, D. C., M. A. Jackson und J. M. Johnson-Cicalese (1988):

A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses. Phytopathology 78: 237–239.

Schmidt, S. P. und T. G. Osborn (1993):

Effects of endophyte infected tall fescue on animal performance. *Agr. Ecosyst. and Envir.* 44: 233–262.

Schnitzius, J. M., N. S. Hill, C. S. Thompson und A. M. Craig (2001):

Semiquantitative determination of ergot alkaloids in seed, straw, and digesta samples using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13: 230–237.

Scott, P.M. (1993):

Gas chromatography of mycotoxins. In: Betina, V. (Hrsg.): *Chromatography of mycotoxins. Techniques and applications.* Elsevier, Amsterdam, 373–425.

Scott, P. M. (2007):

Analysis of ergot alkaloids-a review. *Mycotoxin Research* 23: 113–121.

Seybold, S., G. Philippi und A. Wörz (1998):

Die Farn-und Blütenpflanzen Baden-Württembergs. 7. Auflage. Ulmer Verlag, Stuttgart.

Shelby, R. A. (1996):

Detecting ergot alkaloids by immunoassay. In: Beier, R. C. und L. H. Stanker (Hrsg.): *Immunoassays for Residue Analysis: Food Safety.* ACS Symposium Series 621. American Chemical Society, Washington, DC, 231–242.

Shelby, R. A., R. C. Bridgman, F. T. Smith und V. R. Atigadda (1998):

Determination of ergovaline in tall fescue by a specific monoclonal antibody. *Food Agric. Immunol.* 10: 339–347.

Shelby, R. A. und V. C. Kelley (1991a):

An immunoassay for ergotamine and related alkaloids. *J. Agric. Food. Chem.* 38: 1130–1134.

Shelby, R. A. und V. C. Kelley (1991b):

Detection of ergot alkaloids in tall fescue by competitive immunoassay with monoclonal antibody. *J. Agric. Food Immunol.* 3: 169–177.

Siegel, M. R., G. C. M. Latch, L. P. Bush, F. F. Fannin, D. D. Rowan, B. A. Tapper, C. W. Bacon und M. C. Johnson (1990):

Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. *J. Chem. Ecol.* 16: 3301–3315.

Siegel, M. R., G. C. M. Latch und M. C. Johnson (1987):

Fungal endophytes of grasses. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25: 293–315.

Spratling, F. R. (1972):

Ergotism in lambs. *Vet. Rec.* 90: 166.

Starke, K. (2001):

Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme. In: Forth, W., D. Henschler, W. Rummel, U. Förstermann und K. Starke (Hrsg.): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* 8. Aufl., Urban & Fischer Verlag, München, Jena.

Strasburger-Lehrbuch der Botanik (2008):

Begr. v. Eduard Strasburger u. a.; Neubearb. v. Andreas Bresinsky, Christian Körner, Joachim W. Kadereit u. a., 35. Auflage, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin.

Stuedemann, J. A., N. S. Hill, F. N. Thompson, R. A. Fayrer-Hosken, W. P. Hay, D. L. Dawe, D. H. Seman und S. A. Martin (1998):

Urinary and biliary excretion of ergot alkaloids from steers that grazed endophyte-infected tall fescue. *J. Anim. Sci.* 76: 2146–2154.

Teuteberg, A. (1987):

Mutterkorn an Kultur- und Wildgräsern. *Gesunde Pflanzen* 4: 145–150.

Tfelt-Hansen, P., P. R. Saxena, C. Dahlöf, J. Pascual, M. Láinez, P. Henry, H.-C. Diener, J. Schoenen, M. D. Ferrari und P. J. Goadsby (2000):

Ergotamine in the acute treatment of migraine. A review and European consensus. *Brain* 123: 9–18.

Tfelt-Hansen, P., P. R. Saxena und M. D. Ferrari (1995):

Ergot alkaloids. In: de Wolff, F. A. (Hrsg.): *Handbook of clinical neurology: intoxications of the nervous system*, part II. Elsevier Science, 61–78.

Thompson, F. N. und J. A. Stuedemann (1993):

Pathophysiology of fescue toxicosis. *Agric. Ecosyst. and Envir.* 44: 263–281.

Vogl, A.E. (1898):

Mehl und die anderen Mehlprodukte der Cerealien und Leguminosen. *Nahrungsm. Unters. Hyg. Warenk.* 12: 25–29.

Walzel B., B. Riederer und U. Keller (1997):

Mechanism of alkaloid cyclopeptide synthesis in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Chemistry & Biology* 4: 223–230.

Ware, M. G., G. Price, L. Carter und R. Eitenmiller (2000):

Liquid chromatographic preparative method for isolation of ergot alkaloids, using a particle-loaded membrane extracting disk. *J. AOAC Int.* 83: 1395–1399.

West, C. P., E. Izeke, K. E. Turner und A. A. Elmi (1993):

Endophyte effects on growth and persistence of tall fescue along a water-supply gradient. *Agron. J.* 85: 264–270.

Westendorf, M. L., G. E. Mitchell jr., R. E. Tucker, L. P. Bush, R. J. Petroski und R. G. Powell (1993):

In vitro and in vivo ruminal and physiological responses to endophyte-infected tall fescue. *J. Dairy Sci.* 76: 555–63.

Whittemore, C.T., R.C. Macer, J.K. Miller und P.G. Mantle (1976):

Some consequences of the ingestion by young and growing pigs of feed contaminated with ergot. *Res. Vet. Sci.* 20: 61–69.

Whittemore, C.T., J.K. Miller und P.G. Mantle (1977):

Further studies concerning the toxicity of ingested ergot sclerotia (*Claviceps purpurea*) to young and growing pigs. Res. Vet. Sci. 22: 146–150.

Wolff, J. (1992):

Mutterkorn in Getreide und Getreideprodukten. In: H. D. Ocker (Hrsg.): Rückstände und Kontaminanten in Getreide und Getreideprodukten. Behr's Verlag, Hamburg, 113–137.

Wolff, J., W. I. F. Richter und B. Spann (1995):

Mutterkornalkaloide in der Milch ? VDLUFA-Schriftenreihe, Kongressband 18: 515–524.

Woods, A.J., J. Bradley-Jones und P.G. Mantle (1966):

An outbreak of gangrenous ergotism in cattle. Vet.Rec. 78: 742–749.

Wyss, U., R. Vogel, W. Richter und J. Wolff (1997):

Grünlandextensivierung und Mutterkornbesatz. Agrarforschung 4: 373–376.

Yates, S. G., R.D. Plattner und G. B. Garner (1985):

Detection of ergopeptine alkaloids in endophyte-infected, toxic KY-31 tall fescue by mass spectrometry/mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 33: 719–722.

Yates, S. G. und R. G. Powell (1988):

Analysis of ergopeptine alkaloids in endophyte-infected tall fescue. J. Agric. Food Chem. 36: 337–340.

Young, J. C. und R. R. Marquardt (1982):

Effects of ergotamine tartrate on growing chickens. Can. J. Anim. Sci. 62: 1181–1191.

Zabalgoeazcoa, I. und S. Bony (2005):

Neotyphodium Research and Application in Europe. In: Roberts, C. A., West, C. P. und D. E. Spiers (Hrsg.): *Neotyphodium* in cool-season grasses. Blackwell Publishing, USA, 23–33.

Zhang, Q., D. E. Spiers, G. E. Rottinghaus und G. B. Garner (1994):

Thermoregulatory effects of ergovaline isolated from endophyte-infected tall fescue seed on rats. J. Agric. Food Chem. 42: 954–958.

Anhang zum Literaturverzeichnis

Rechtsgrundlagen

Futtermittelgesetz (FuMiG)

in der Fassung vom 25. August 2000

zuletzt geändert durch: Artikel 1 des Gesetzes vom 21. Juli 2004 (Bundesgesetzblatt I S. 1756)

aufgehoben durch Artikel 7 des Gesetzes zur Neuordnung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts vom 1. September 2005 (Bundesgesetzblatt I S. 2618)

Futtermittelverordnung (FuMiV)

in der Fassung vom 24. Mai 2007

zuletzt geändert durch: Artikel 2 der Verordnung vom 3. Dezember 2009 (Bundesgesetzblatt I S. 3842)

8 ANHANG

Anhang 1: Übersicht über die untersuchten *F. arundinacea*-Proben und die Ergebnisse der Untersuchungen des Gesamt-ergotalkaloidgehaltes mittels gruppenspezifischem „Generic Ergot Alkaloid“-EIA sowie der EIAs auf Ergotamin, α -Ergocryptin und Ergocornin

Proben-nummer	Proben-herkunft	Proben-material	Vegetations-periode	Generic Ergot Alkaloid-EIA ($\mu\text{g/kg}$)	Ergotamin-EIA ($\mu\text{g/kg}$)	α -Ergocryptin-EIA ($\mu\text{g/kg}$)	Ergocornin-EIA ($\mu\text{g/kg}$)
1	NRW	ges. Pflz.	I	< 40	30	1200	8100
2	NRW	ges. Pflz.	I	730	700	4900	8700
3	NRW	ges. Pflz.	I	50	70	2400	11900
4	NRW	ges. Pflz.	I	< 40	60	3000	15000
5	NRW	ges. Pflz.	I	< 40	50	1200	14600
6	NRW	ges. Pflz.	I	< 40	50	1200	18600
7	NRW	ges. Pflz.	I	80	70	< 450	13700
8	NRW	ges. Pflz.	I	<40	40	500	11600
9	NRW	ges. Pflz.	I	<40	50	< 450	18800
10	NRW	ges. Pflz.	I	300	100	1000	11500
11	NRW	ges. Pflz.	I	< 40	50	1400	18000
12	NRW	ges. Pflz.	I	100	70	1800	21300
13	NRW	ges. Pflz.	I	300	200	1600	14900
14	NRW	ges. Pflz.	I	< 40	30	1400	10800
15	NRW	ges. Pflz.	I	4300	700	29100	45500
16	NRW	ges. Pflz.	I	60	700	1900	13800
17	NRW	ges. Pflz.	I	2100	600	2400	10300
18	NRW	ges. Pflz.	I	7400	100	20400	15700
19	NRW	ges. Pflz.	I	2200	900	5200	5700
20	NRW	ges. Pflz.	I	200	20	2200	11700
21	NRW	ges. Pflz.	I	< 40	50	1900	13400
22	NRW	ges. Pflz.	I	90	50	2100	11300
23	NRW	ges. Pflz.	I	500	40	1300	5500
24	NRW	ges. Pflz.	I	7500	1300	6700	16600
25	NRW	ges. Pflz.	I	50	50	1800	78800
26	NRW	ges. Pflz.	I	100	60	900	16300
27	NRW	ges. Pflz.	I	600	100	1000	16300
28	NRW	ges. Pflz.	I	< 40	20	600	16500

29	NRW	ges. Pflz.	I	100	80	< 450	15000
30	NRW	ges. Pflz.	I	2000	300	2000	13100
31	NRW	Blätter	I	< 40	20	< 450	17100
32	HE	Blätter	I	< 40	20	700	12600
33	NRW	Blätter	I	40	20	< 450	27400
34	HE	Blätter	I	< 40	20	< 450	13400
35	NRW	Blätter	I	350	50	500	75200
36	HE	Blätter	I	70	30	1000	7400
37	NRW	Blüten	I	< 40	30	900	n. u.
38	NRW	Blüten	I	< 40	< 20	< 450	n. u.
39	NRW	Blätter	II	< 40	100	3700	2400
40	NRW	Blätter	II	40	< 20	5600	5500
41	NRW	Blätter	II	< 40	30	7400	5300
42	NRW	Blätter	II	< 40	100	11800	6700
43	NRW	Blätter	II	100	100	3000	12200
44	NRW	Blätter	II	< 40	30	5500	9200
45	HE	Blätter	II	70	100	8400	15900
46	BW	Blätter	II	50	100	2600	4900
47	HE	Blätter	II	100	200	13800	7900
48	NRW	Blätter	II	200	100	7400	3700
49	NRW	Blätter	II	100	200	6300	< 1700
50	NRW	Blätter	II	100	200	3500	< 1700

BW= Baden-Württemberg; HE= Hessen; NRW= Nordrhein-Westfalen

ges. Pflz.: gesamte Pflanze, bestehend aus Blättern, Blüte und Halm

n. u.: nicht untersucht

Anhang 2: Übersicht über die untersuchten *L. perenne*-Proben und die Ergebnisse der Untersuchungen des Gesamtergotalkaloidgehaltes mittels gruppenspezifischem „Generic Ergot Alkaloid“-EIA sowie der EIAs auf Ergotamin, α -Ergocryptin und Ergocornin

Proben-nummer	Proben-herkunft	Proben-material	Vegetations-periode	Generic Ergot Alkaloid-EIA ($\mu\text{g/kg}$)	Ergotamin-EIA ($\mu\text{g/kg}$)	α -Ergocryptin-EIA ($\mu\text{g/kg}$)	Ergocornin-EIA ($\mu\text{g/kg}$)
51	NRW	ges. Pflz.	I	200	100	500	< 1700
52	NRW	ges. Pflz.	I	4600	200	2700	7300
53	NRW	ges. Pflz.	I	5500	400	4000	8300
54	NRW	ges. Pflz.	I	4400	200	5300	19500
55	NRW	ges. Pflz.	I	1400	1700	1300	7000
56	NRW	ges. Pflz.	I	200	100	700	5300
57	NRW	ges. Pflz.	I	400	300	800	3000
58	NRW	ges. Pflz.	I	1000	50	500	2600
59	NRW	ges. Pflz.	I	200	40	< 450	2600
60	NRW	ges. Pflz.	I	200	300	500	3300
61	NRW	ges. Pflz.	I	2900	1000	5200	6200
62	NRW	ges. Pflz.	I	< 40	70	1600	4000
63	NRW	ges. Pflz.	I	5500	600	8100	13300
64	NRW	ges. Pflz.	I	3500	500	7300	11200
65	NRW	ges. Pflz.	I	3300	1700	2600	4900
66	NRW	ges. Pflz.	I	3800	700	5400	11000
67	NRW	ges. Pflz.	I	300	200	3100	3300
68	NRW	ges. Pflz.	I	19500	400	3000	4500
69	NRW	ges. Pflz.	I	5500	900	8100	15200
70	NRW	ges. Pflz.	I	50	100	700	6000
71	NRW	ges. Pflz.	I	400	200	2200	3100
72	NRW	ges. Pflz.	I	28600	2400	45300	82600
73	NRW	ges. Pflz.	I	400	400	2500	8600
74	NRW	ges. Pflz.	I	< 40	70	1500	15000
75	NRW	ges. Pflz.	I	7800	1900	11500	30100
76	NRW	ges. Pflz.	I	500	300	1200	3700
77	NRW	ges. Pflz.	I	17200	1400	24300	27100
78	NRW	ges. Pflz.	I	700	100	1100	2700
79	NRW	ges. Pflz.	I	1900	200	3400	9400

80	NRW	ges. Pflz.	I	6000	2000	7400	14900
81	NRW	Blätter	I	< 40	20	1400	8900
82	NRW	Blätter	I	< 40	20	1300	6600
83	NRW	Blätter	I	< 40	< 20	< 450	2000
84	NRW	Blüten	I	1500	1000	3700	n. u.
85	NRW	Blüten	I	3700	900	2200	n. u.
86	NRW	Blätter	II	40	30	10500	< 1700
87	NRW	Blätter	II	40	90	8500	< 1700
88	NRW	Blätter	II	< 40	30	6200	2600
89	NRW	Blätter	II	40	80	9800	< 1700
90	NRW	Blätter	II	100	40	14000	9800
91	NRW	Blätter	II	200	80	9600	7500
92	HE	Blätter	II	100	< 20	3400	6000
93	BW	Blätter	II	100	40	3100	6300
94	HE	Blätter	II	40	30	4200	3400
95	NRW	Blätter	II	100	100	2200	2300
96	NRW	Blätter	II	100	20	9300	2900
97	NRW	Blätter	II	40	30	3900	2300

BW= Baden-Württemberg; HE= Hessen; NRW= Nordrhein-Westfalen
ges. Pflz.: gesamte Pflanze, bestehend aus Blättern, Blüte und Halm
n. u.: nicht untersucht

Anhang 3: Übersicht über sonstige untersuchte *Poaceae*-Proben und die Ergebnisse der Untersuchungen des Gesamtergotalkaloidgehaltes mittels gruppenspezifischem „Generic Ergot Alkaloid“-EIA sowie der EIAs auf Ergotamin, α -Ergocryptin und Ergocornin

Proben-nummer	Proben-art	Proben-material	Proben-herkunft	Vegeta-tionsperiode	Generic Ergot Alkaloid-EIA ($\mu\text{g/kg}$)	Ergo-tamin-EIA ($\mu\text{g/kg}$)	α -Ergocryp-tin-EIA ($\mu\text{g/kg}$)	Ergocor-nin-EIA ($\mu\text{g/kg}$)
98	<i>DG</i> ¹	Blätter	NRW	I	< 40	< 20	800	3900
99	<i>DG</i>	Blüten	NRW	I	< 40	30	900	n. u.
100	<i>DG</i>	Blüten	NRW	I	200	300	3000	n. u.
101	<i>AP</i> ²	Blätter	NRW	I	< 40	20	1100	4300
102	<i>AP</i>	Blüten	NRW	I	300	20	600	n. u.
103	<i>PM</i> ³	Blätter	NRW	I	< 40	20	2800	5700
104	<i>PM</i>	Blüten	NRW	I	< 40	20	900	n. u.

NRW= Nordrhein-Westfalen

ges. Pflz.: gesamte Pflanze, bestehend aus Blättern, Blüte und Halm

n. u.: nicht untersucht

¹*DG*: *Dactylus glomerata*

²*AP*: *Alopecurus pratensis*

³*PM*: *Plantago major*

Anhang 4: Übersicht über die Ergotalkaloidgehalte in *F. arundinacea* und *L. perenne*,
Bestimmung mittels HPLC

Ergot-alkaloid	Ergotalkaloidgehalt (µg/kg)										
	FA (1)*	FA (2)	FA (15)	FA (25)	FA (35) Blätter	LP (52)	LP (53)	LP (54)	LP (55)	LP (58)	LP (61)
Ergo-metrin	17	17	655	111	13	53	48	143	39	33	381
Ergo-metrinin	35	36	65	26	10	50	24	343	82	55	10
Ergosin	6	400	830	13	15	217	284	668	104	6	664
Ergosinin	<0,74	60	164	11	110	39	44	94	16	< 0,74	136
Ergo-tamin	5	20	300	86	80	24	243	112	728	21	300
Ergo-taminin	<0,54	5	25	16	26	1,7	10	5	74	< 0,54	16
Ergo-cornin	<0,23	<0,23	1100	8	< 0,23	115	1074	1264	101	3	269
Ergo-corninin	<0,32	<0,32	112	4	< 0,32	21	138	141	10	< 0,32	29
α-Ergo-cryptin	<0,47	<0,47	2510	13	< 0,47	824	2330	3266	1140	1195	1006
α-Ergo-cryptinin	4	11	405	11	7	28	30	103	16	< 0,35	25
β-Ergo-cryptin	<0,52	<0,52	3300	<0,52	< 0,52	<0,52	160	376	92	< 0,52	26
β-Ergo-cryptinin	<0,37	<0,37	435	<0,37	< 0,37	7	32	45	18	< 0,37	7
Ergo-cristin	10	255	<0,77	<0,77	< 0,77	26	<0,77	<0,77	< 0,77	< 0,77	117
Ergo-cristinin	2	44	<0,45	<0,45	< 0,45	152	373	522	210	277	464
Gesamt	79	848	9900	300	260	1557	4790	7090	2630	1590	3460

*Werte in Klammern: Probennummern

Anhang 5: Vergleich der Ergotalkaloidgehalte in *F. arundinacea* und *L. perenne*,
HPLC-EIAs

Methode	Ergotalkaloidgehalt (µg/kg)										
	FA (1)*	FA (2)	FA (15)	FA (25)	FA (35) Blätter	LP (52)	LP (53)	LP (54)	LP (55)	LP (58)	LP (61)
HPLC**	79	848	9900	300	260	1560	4790	7090	2630	1590	3460
Generic Ergot Alkaloid- EIA	30	730	4300	50	350	4600	5500	4400	1400	1000	2900
Ergo- cornin- EIA	8100	8700	45500	78800	75200	7300	8300	19500	7000	2600	6200
Ergota- min-EIA	30	700	700	50	50	200	400	200	1700	50	1000
α-Ergo- cryptin- EIA	1200	4900	29100	1800	500	2700	4000	5300	1300	500	5200

*Werte in Klammern: Probennummern

**Die entsprechenden Werte sind in Anhang 4 aufgeführt

Anhang 6



Abb. 1: *Alopecurus pratensis*, gesunde und mit Mutterkorn infizierte Pflanze



Abb. 2: *Dactylus glomerata*, mit Mutterkorn infizierte und gesunde Pflanze



Abb. 3: *Plantago major*

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. E. Usleber für die Überlassung des interessanten Themas und die stets gewährte freundliche Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. V. Curtui danke ich herzlich für die fachliche Beratung und kooperative Zusammenarbeit insbesondere bei der Durchführung der chromatographischen Untersuchungen.

Mein Dank gilt ferner allen Mitarbeitern der Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima während der Zeit meiner Labortätigkeit.

Besonders möchte ich mich bei Frau R. Stumpf und bei Frau M. Kessler für die Einarbeitung in die Arbeitstechniken und die gewährte Hilfe in einer schwierigen persönlichen Situation bedanken.

Ich bedanke mich bei meiner Schwester Simone für die zahlreichen Tipps und die Durchsicht dieser Arbeit.

Meinem Sohn Louis danke ich für sein Dasein und die dadurch so wunderbare Gestaltung meiner arbeitsfreien Zeit.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Mann Stefan, die mir die Durchführung dieser Arbeit durch ihre Unterstützung und Nachsicht erst ermöglicht haben.

Eidesstattliche Erklärung:

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Jasmin Riemel



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5872-2



9 783835 195872

Cover photo: © johannesspreiter - Fotolia.com